PHYSIKALISCHE KARTIERUNG DER MITOCHONDRIALEN DNA AUS NEUROSPORA CRASSA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hans-Ulrich Bernard
aus Hildesheim

Göttingen 1975

PHYSIKALISCHE KARTIERUNG DER MITOCHONDRIALEN DNA AUS NEUROSPORA CRASSA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Hans-Ulrich Bernard
aus Hildesheim

Göttingen 1975

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen, durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Dr. H. Küntzel

Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 7. 75

Die Arbeit wurde eingereicht am 22. 5. 75

Vera gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGEN

EINLEITUNG.....1

METHODEN.....6

1. Materialien.....6

2. Anzucht von Neurospora crassa.....7

3. Isolierung und Reinigung der Mitochondrien.....9

4. Isolierung der mitochondrialen DNA.....10

5. OD-Messungen.....12

6. Radioaktive Markierungen und Bestimmungen.....12

7. Sucrose-Gradienten-Zentrifugation.....13

8. Basenanalyse.....13

9. Eco R I-Spaltung.....14

10. Agarose-Gel-Elektrophorese.....14

11. Präparation der DNA zur Elektronenmikroskopie.15

12. Partielle Denaturierung der DNA.....15

13. Elektronenmikroskopie und Auswertung der Mikrografien.....16

14. Computer-Analyse.....16

ERGEBNISSE.....17

1. Schwebedichten zweier DNA-Fraktionen, die mit Mitochondrien assoziiert sind.....17

2. Längenverteilung cytoplasmatischer DNA.....20

3. Längenverteilung isolierter mtDNA.....22

4. Elektronenmikroskopie der zirkulären mtDNA....26

Seite

5. Kleine zirkuläre mtDNA..... 29

6. Partielle Denaturierung..... ...30

6.1. Allgemeine Aspekte der Charakterisierung einer DNA durch elektronenmikroskopische Abbildung des partiell denaturierten Moleküls..... ...30

6.2. Partielle Denaturierung bei 48 °C.....33

6.3. Partielle Denaturierung bei 49 °C.....35

6.4. Das Verhalten von cccDNA bei partieller Denaturierung bei 49 °C.....36

6.5. Partielle Denaturierung von ocDNA bei 49 °C...36

6.6. Anordnung partiell denaturierter linearer Moleküle relativ zur zirkulären AT-Karte.....43

7. Spaltung der mtDNA durch die Restriktionsendonuklease Eco R I.....45

7.1. Die Verwendung von Restriktionsenzymen zur DNA-Kartierung.....45

7.2. Charakterisierung der Eco R I-Fragmente der mtDNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese und elektronenmikroskopische Konturlängenmessung.....46

8. Partielle Denaturierung der Eco R I-gespaltenen mtDNA und Lokalisation der Fragmente relativ zu der AT-Karte der zirkulären DNA.....50

DISSKUSSION..... 54

1. Die Degradation der zirkulären mtDNA.....54

Seite

2. Die AT-Kartierung der zirkulären mtDNA.....56

3. Die Fragmentierung der mtDNA mit Hilfe des Restriktionsenzyms Eco R I.....57

ZUSAMMENFASSUNG.....62

LITERATURVERZEICHNIS.....64

LEBENSLAUF.....70

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
AT-Karte	Denaturierungskarte, Karte Adenin- und Thymin-reicher Regionen
C	Cytosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cccDNA	zirkulär kovalent geschlossene Form der DNA (circular covalently closed DNA)
cytoDNA	cytoplasmatische DNA
mtDNA	mitochondriale DNA
ocDNA	offen zirkuläre Form der DNA (open circular DNA)
Eco R I	Restriktionsendonuklease Eco R I
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
G	Guanin
GC-Gehalt	Prozentsatz der Basen Guanin und Cytosin bezogen auf die Summe aller vier Basen
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil

EINLEITUNG

Mitochondrien, die Atmungsorganellen der Eukaryonten, enthalten eine eigene DNA (mtDNA), eigene Enzyme des genetischen Apparates und eigene Ribosomen. Die mtDNA muß unentbehrliche Informationen enthalten, da mit ihrem vollständigen Verlust oder teilweiser Deletion auch die Funktionsfähigkeit des Mitochondrions verloren geht (1). Doch ist die Überzahl aller Proteine in Mitochondrien, selbst der Enzyme des genetischen Apparates, im Zellkern kodiert, wird auf cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und in das Mitochondrion importiert (2).

Es ist gesichert, daß von der mtDNA ein Satz der beiden rRNAs der mitochondrialen Ribosomen kodiert wird (3, 4) sowie 12 (in höheren Eukaryonten wie HeLa-Zellen (4)) oder 20 bis 30 tRNAs (in niederen Eukaryonten wie Hefe (5)).

Nach derzeitigem Wissen werden 8 Proteine, die ohne Ausnahme Bestandteile der inneren Membran des Mitochondrions sind, auf mitochondrialen Ribosomen synthetisiert. Die Information für sie ist daher entweder in der mtDNA enthalten, oder sie wird - sollte sie im Zellkern kodiert sein - als mRNA aus dem Cytoplasma importiert. Bei diesen 8 mitochondrialen Translationsprodukten handelt es sich um intrinsische Membranproteine, die Untereinheiten der ATPase, der Cytochromoxidase und Cytochrom b sind, wogegen die peripheren Membranproteine

dieser drei Enzyme im Cytoplasma translatiert werden (2).

Darüber hinaus kann nur mit wenigen Genprodukten der mtDNA, etwa regulatorischen Proteinen (6, 7), gerechnet werden.

Obwohl es keine Hinweise gibt, daß sich der Informationsgehalt der mtDNA verschiedener Organismen erheblich unterscheidet, bestehen zwischen den physikalischen Eigenschaften verschiedener mtDNAs große Unterschiede. So stehen beispielsweise den tierischen mtDNAs mit Molekulargewichten von 9 bis 12 x 10^6 die erheblich längeren mtDNAs niederer Eukaryonten und Pflanzen mit Molekulargewichten zwischen 30 und 50 x 10^6 gegenüber (1). Auch innerhalb dieser Größenklassen bestehen Unterschiede, z. B. im GC-Gehalt, der für die kleinen tierischen mtDNAs zwischen 20 und 50 % variieren kann (8, 9). Diese Daten zeigen, daß eine homologe Zellkomponente, hier also die mtDNA, in der Evolution eine sehr divergente Entwicklung durchlaufen haben kann.

In dieser Arbeit sollte jedoch der Vergleich der mtDNA von Neurospora mit mtDNAs anderer Organismen nur am Rand betrachtet werden. Der Schwerpunkt der Arbeit lag in der Entwicklung einer physikalischen Kartierung der mtDNA, die eine Vorstufe für eine genetische Karte ist. Im folgenden soll erläutert werden, warum dieser Ansatz als Alternativmethode zur genetischen Kartierung gewählt wurde.

Der am häufigsten begangene Weg, ein Genom zu kartieren, führt über eine statistische Analyse der Rekombinanten in einem Kreuzungsexperiment. Voraussetzungen für diese genetische Methodik sind das Vorhandensein zahlreicher genetischer Marker, Hypothesen über die Vorgänge, die der Rekombination vorausgehen und Kenntnis der Segregation der Genome nach dem Kreuzungsexperiment.

Diese Voraussetzungen sind für die mitochondriale Genetik nur beschränkt erfüllt.

Nur von Hefe-Mitochondrien sind genetische Marker bekannt. Von ihnen besteht eine Gruppe in der Resistenz gegen Inhibitoren der mitochondrialen Translation (Chloramphenicol, Erythromycin) oder im Verlust dieser Resistenz. Diese Marker müssen innerhalb der rRNA-Gene liegen, da die mitochondrialen ribosomalen Proteine im Cytoplasma synthetisiert werden und vermutlich im Kern kodiert sind. - Dagegen wird durch eine Gruppe von Mutanten, die resistent gegen Inhibitoren der mitochondrialen ATPase wie Oligomycin sind, ein mitochondrial kodiertes Protein erfaßt, vermutlich eine Untereinheit des Membranteils (CF_o) der ATPase (10).

Im Fall beider Mutanten-Gruppen ist aber die Überprüfung nötig, ob nicht bereits der Transport des Inhibitors in das Mitochondrion inhibiert ist, womit bei extrachromosomalem Erbgang ein Hinweis für ein mitochondrial kodiertes Membranprotein existierte.

Ebenfalls nur von Hefe gibt es Mutanten ("Petite"-Mutanten), bei denen Deletions- oder "Nonsense"-Mutationen der mtDNA zu funktionsunfähigen Mitochondrien geführt haben, da Hefe als einziger Eukaryont ohne die mitochondriale Energiegewinnung wachsen kann (11).

Schwierigkeiten für die mitochondriale Genetik entstehen auch daher, daß nur hypothetische Vorstellungen über die Natur der mitochondrialen Sexualität bestehen (10), und daß weiterhin der Nachweis erbracht werden muß, daß das Kreuzungsexperiment zu einer Rekombination der mtDNAs geführt hat, und nicht nur zwei verschiedene mtDNAs nebeneinander bestehen.

Mitochondriale Antibiotika-Resistenz-Mutanten von Neurospora sind nicht bekannt. Unter einigen extrachromosomal vererbten Mutanten mit pleiotropem Phänotyp ist "Poky" das bestuntersuchte Beispiel: "Poky" enthält in der log-Phase des Wachstums Cytochrom a und b in stark verminderter Konzentration. Dieser Phänotyp kommt durch einen Mangel an der kleinen ribosomalen Untereinheit zustande, dieser wiederum durch eine Untermethylierung der rRNA (12). Ebenfalls wurde eine Untermethylierung eines Lysinrestes von Cytochrom c beschrieben (13) sowie veränderte mitochondriale tRNAs (14). Dieser Phänotyp könnte durch den Defekt eines methylierenden Enzyms, das mitochondrial kodiert wäre, erklärt werden.

Die Schwierigkeiten der genetischen Kartierung der mtDNA legen eine Kartierung mit biochemischen und physikalischen Methoden nahe. Derartige Methoden haben bereits bei der Kartierung des mitochondrialen Genoms von HeLa-Zellen zu Erfolgen geführt: Die beiden Stränge der mtDNA konnten durch ihren unterschiedlichen GC-Gehalt im alkalischen CsCl-Gradienten als H- und L-Strang getrennt werden. Durch Hybridisierung dieser Stränge mit rRNA und tRNA konnten die Positionen der Gene für die beiden rRNAs und von 9 tRNAs auf dem H-Strang, und von 3 tRNAs auf dem L-Strang bestimmt werden (3).

Dieser Weg kann für die mtDNA niederer Eukaryonten nicht beschritten werden, da eine Isolation der intakten, d. h. zirkulären mtDNA nicht möglich war (1). Ebenfalls ist es bisher nicht gelungen, die beiden Stränge der mtDNA zu trennen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden entwickelt, die es ermöglichen, ein unspezifisch degradiertes DNA-Molekül physikalisch zu kartieren. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden wurde die Verteilung AT-reicher Regionen in der mtDNA von Neurospora ermittelt. Nach spezifischer Fragmentierung mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease ist eine Anordnung der Fragmente relativ zu der AT-Karte möglich. Eine künftige Verfeinerung dieser Fragmentkarte sowie eine Hybridisierung der DNA-Fragmente mit rRNA, tRNA und mRNA ist ein mit derzeit verfügbaren Methoden gangbarer Weg zur Erstellung einer Genkarte des mitochondrialen Genoms von Neurospora.

METHODEN

1. Materialien

Neurospora crassa: Wildtyp Stamm 5256

"Poky": extrachromosomale Mutante mi-1

Chemikalien: Agarose: Sigma

Alkalische Phosphatase(E. coli): Boehringer

Cytochrom c: Serva

DNase I (Rinderpankreas): Boehringer

Ethidiumbromid: Serva

Pronase: Serva

Radioisotopen: ^{3}H-Uracil: Schwarz/Mannheim

Na [^{32}P]-Phosphat: Amersham

Rinderserumalbumin: Serva

RNase A: Worthington

RNase T_1: Boehringer

Schlangengiftphosphodiesterase: Boehringer

RNase A (1 mg/ml) und RNase T_1 (500 Einheiten/ml) wurden in 0,15 M NaCl pH 5,1 für 10 min auf 90 °C erhitzt und bei - 20 °C eingefroren aufbewahrt. - Pronase (20 mg/ml) wurde 2 h bei 37 °C vorverdaut, das unlösliche Material abzentrifugiert und die Lösung bei - 20 °C eingefroren aufbewahrt.

Endonuklease Eco R I und Phage λ - DNA wurden von Dr. E. BADE (Institut für Genetik der Gesellschaft für Strahlenforschung, Göttingen) isoliert und für diese Arbeiten zur Verfügung ge-

stellt. Eco R I war frei von unspezifischen DNasen, wie die scharfen Banden in der Agarose-Gel-Elektrophorese nach bis zu 16 h Verdauung der λ-DNA zeigten (siehe Abb. 15).

Darüber hinaus wurden die handelsüblichen Chemikalien der Firma Merck benutzt.

Pufferlösungen:

ET-1: 0,05 M EDTA; 0,1 M Tris/HCl pH7,5
ETS-1: 0,005 M EDTA; 0,01 M Tris/HCl; 0,44 M Sucrose pH 7,5
ET-2: 0,1 M EDTA; 0,01 M Tris/HCl pH 8,0
ETS-2: 0,1 M EDTA; 0,01 M Tris/HCl; 0,44 M Sucrose pH 8,0
ETS-0,9; ETS-1,5; ETS-1,95: wie ETS-1, aber mit 0,9; 1,5; 1,95 M Sucrose
SSC: 150 mM NaCl; 15 mM Na-Citrat pH 8,0
MTS: 0,005 M $MgCl_2$; 0,02 M Tris/HCl; 0,44 M Sucrose pH 7,5

2. Anzucht von Neurospora crassa

Neurospora crassa wurde in einer Nährlösung angezogen, die je 1 l 26 ml Sucrose-Lösung (2,2 M) und 20 ml des folgenden Mineralmediums enthielt (modifiziert nach VOGEL (15)):

In 3750 ml H_2O dest. wurden gelöst:

Na_3-Citrat·$2H_2O$	620 g
KH_2PO_4 anhydr.	12,5 g
NH_4NO_3 anhydr.	500 g
$MgSO_4$	50 g
KCl	676 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	25 g
Spurenelement-Lösung	50 ml
Biotin-Lösung	12,5 ml

Spurenelement-Lösung: in 95 ml H_2O dest. wurden gelöst:

Zitronensäure·H_2O	5,0 g
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	5,0 g
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6\ H_2O$	1,0 g
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,25 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g
H_3BO_3 anhydr.	0,05 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,05 g
Chloroform	1,0 ml

Biotin-Lösung: 5 mg Biotin (Merck) in 50 ml H_2O dest.

Der Nährlösung von "Poky" wurden zusätzlich 0,2 g Nikotinsäureamid/1 zugefügt.

Die Anzucht erfolgte entweder in 10 l-New Brunswick-Fermentern (Impfmenge 50 ml Konidien-Suspension, 10^8 Konidien/ml, Rührung mit 300 Umdrehungen pro min, ohne zusätzliche Belüftung) oder in 2 l-Erlenmeyerkolben (800 ml Nährlösung + 10 ml Konidiensuspension, Schüttler mit 200 Umdrehungen pro min) bei 30 °C. Die Ernte erfolgte in der spätlogarithmischen Phase nach 14 bis 16 Stunden durch Absaugen der Kultur über einen Büchner-Trichter und Nachwaschen mit ETS-1.
Ausbeuten: 10 bis 20 g Feuchtgewicht pro l.

3. Isolierung und Reinigung der Mitochondrien

Die Mitochondrien-Isolierung folgte der Beschreibung von SCHÄFER et al. (16):

Die Hyphen wurden in ETS-1 resuspendiert, in einem Star-Mix homogenisiert und in einer Korundmühle (17) zerrieben.

Alle folgenden Schritte wurden bei 0 bis 4 °C ausgeführt. Das Homogenat wurde 10 min bei 1600 g zentrifugiert (Pelletierung der Zellwände und Zellkerne). Aus dem Überstand wurden bei 35000 g (20 min) die Mitochondrien abzentrifugiert. Die Mitochondrien wurden in MTS-Puffer resuspendiert und mit 50 µg DNase I/ml 30 min bei 4 °C zur Verdauung von kontaminierender Kern-DNA versetzt. Die Reaktion wurde mit 1 bis 3 Volumina ETS-2 abgestoppt und die Mitochondrien abzentrifugiert (35000 g, 20 min). Nach Resuspension in

ETS-1 wurden die Mitochondrien auf einen diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten pipettiert (15 ml ETS-1,95, 3 ml ETS-1,5, 25 ml ETS-0,9) und 30 min bei 24000 rpm (Beckmann L2-65 B-Zentrifuge, SW 25,2-Rotor) zentrifugiert. Die Zellkerne pelletieren in diesem System, die Mitochondrien bilden eine Bande in der ETS-1,5-Schicht, und die DNase bleibt mit dem Puffer ETS-1 an der Oberfläche des Gradienten. Die Mitochondrien-Bande wurde isoliert, 1 : 3 mit ET-2 verdünnt und die Mitochondrien sedimentiert (35000 g, 20 min). - Ausbeute: 1 bis 2 g Mitochondrien (Feuchtgewicht) pro 100 g Hyphen (Feuchtgewicht).

4. Isolierung der mitochondrialen DNA (mtDNA)

Aus der Mitochondrien-Präparation wurde die mtDNA in Anlehnung an Methoden von NASS (18) isoliert:

Die gereinigten Mitochondrien wurden in einem hypotonischen Puffer (1 x SSC, 100 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert und mit 0,1 Volumen 10 %igem SDS lysiert (20 min, Raumtemperatur). Das Lysat wurde mit 1 Volumen wassergesättigtem Phenol versetzt und etwa 10 min vorsichtig geschüttelt. Die wässrige Phase wurde durch Zentrifugation von Phenol und ausgefallenem Protein getrennt und ein zweites Mal wie beschrieben mit Phenol behandelt. Danach wurde die wässrige Phase 24 bis 36 Stunden gegen 6 bis 8 Wechsel

1 x SSC pH 8,0 dialysiert. Durch Inkubation mit 50 µg RNase A/ml und 25 Einheiten RNase T_1/ml wurde kontaminierende RNA verdaut, die Enzyme wurden wie oben beschrieben durch Phenolextraktion abgetrennt und die wässrige Phase 24 Stunden gegen 6 bis 8 Wechsel 1 x SSC pH 8,0 dialysiert.

Das Dialysat wurde durch Lösung von CsCl auf eine spezifische Dichte von ρ = 1,70 g/ml gebracht und 48 Stunden zentrifugiert (Beckmann L2-65 B-Zentrifuge, R 40 Rotor, 34000 rpm, 20 °C).

Der CsCl-Gradient wurde in 50 bis 60 Fraktionen geteilt, und es wurden von jeder Fraktion die optischen Dichten bei 230, 260 und 280 nm sowie durch Messung des Refraktionsindexes die spezifischen Dichten bestimmt. Auf diese Weise war eine Abtrennung von kontaminierender RNA, Kern-DNA, Polysacchariden und Proteinen möglich, die andere Schwebedichten bzw. Extinktionen haben als die mtDNA.

Die vereinigten mtDNA-Fraktionen wurden gegen 1 x SSC pH 8,0 dialysiert, 16 Stunden (R 40-Rotor, 40000 rpm, 2 °C) zentrifugiert und das DNA-Pellet in 1 x SSC in einer Konzentration von 10 bis 30 OD_{260}/ml (1 OD_{260}/ml = 50 µg/ml) resuspendiert. - Zur Elektronenmikroskopie wurden die mtDNA-Fraktionen des CsCl-Gradienten gegen 0,2 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA pH 7,0 dialysiert und nicht pelletiert.

5. OD-Messungen

OD-Messungen erfolgten in einem PM QII-Spektrophotometer (Zeiss) in 1 ml-Quarzküvetten. Eine DNA wurde als frei von Polysacchariden und Proteinen betrachtet, wenn das Verhältnis OD_{260}/OD_{230} bzw. OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,6 und 2,0 lag. 1 OD_{260}/ml = 50 µg DNA/ml.

6. Radioaktive Markierungen und Bestimmungen

Radioaktiv markierte DNA wurde isoliert wie beschrieben, nachdem den Neurospora-Kulturen pro l entweder 50 µCi ^{3}H-Uracil oder 8 mCi Na [^{32}P]-Phosphat zugesetzt worden war. Uracil wird in der Zelle zu Thymidin umgesetzt und in DNA eingebaut (19).

Die Radioaktivität markierter DNA wurde in einem Packard-Tricarb-Szintillationszähler bestimmt.

Die Proben wurden mit 1 ml BSA-Lösung (200 µg/ml) versetzt und mit 1 ml 10 %iger TCA-Lösung gefällt (30 min, 4 °C). Das ausgefallene Material wurde über Sartorius-Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) abgesaugt, mehrfach mit 5 %iger TCA-Lösung nachgespült, getrocknet und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (8 g PPO, 0,2 g POPOP in 2 l Toluol) versetzt.

7. Sucrose-Gradienten-Zentrifugation

Lineare Sucrose-Gradienten (5 - 20 % Sucrose, 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl pH 8,0; Gesamtvolumen 13 ml, aufgetragene Probe 100 - 300 µl) wurden bei 38000 rpm (4 Stunden, 25 °C, Beckmann L2-65 B-Zentrifuge, SW 40-Rotor) zentrifugiert und fraktioniert (50 - 60 Fraktionen).

Die Fraktionierung erfolgte - wie auch im Fall der CsCl-Gradienten - durch Absaugen des Gradienten vom Boden des Röhrchens aus über eine LKB Perpex peristaltische Pumpe und Auftrennung der Fraktionen mittels eines LKB Ultrorac-Fraktionssammlers.

8. Basenanalyse

10 - 30 µg DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 50 bis 100 µl (20 mM $MgCl_2$, 0,5 x SSC pH 7,0) mit 5 µg DNase I, 5 µl Schlangengiftphosphodiesterase und 5 µl alkalischer Phosphatase 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Nukleoside wurden in einem Nukleosidanalysator (20) quantitativ bestimmt: Trennung über eine Beckmann M 71-Dowex-Säule, konstante Durchflußgeschwindigkeit durch eine Dosapro-Milton-Roy-Mikropumpe, Elution bei 50 °C mit 0,4 M Formiat-Puffer pH 4,65, automatische Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm.

9. Eco R I-Spaltung

mtDNA (2,7 µg/ml) wurde 12 Stunden bei 37 °C inkubiert (0,1 M Tris/HCl pH 7,6, 10 mM $MgSO_4$, 0,02 x SSC, 7 mM β-Mercaptoäthanol) mit der fünffachen Enzymmenge, die zur vollständigen Verdauung einer gleichen Menge λ-DNA benötigt wurde. Die Reaktion wurde durch Einfrieren abgestoppt.

10. Agarose-Gel-Elektrophorese

Agarose-Gel-Elektrophoresen wurden wie von SHARP et al. beschrieben (21) durchgeführt:

Agarose (1,4 % w/v) wurde durch Erhitzen in heißem Puffer E (40 mM Tris/HCl, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA pH 7,9) gelöst, und beim Abkühlen wurde Ethidiumbromid zugesetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Lösung wurde in Slab-Gel-Formen pipettiert und durch Abkühlen auf Raumtemperatur gelatiniert.

Als Elektrophorese-Puffer wurde Puffer E (+ 0,5 µg Ethidiumbromid) benutzt. Die Proben wurden auf 8 % Sucrose/0,025 % Bromphenolblau gebracht und auf das Gel aufgetragen. Durchführung der Elektrophorese bei Raumtemperatur (4 Stunden, 40 mA).

Die Gele wurden unter UV-Bestrahlung mit einer Polaroid-

kamera fotografiert.

Zur Isolation der DNA aus dem Gel wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA aus diesen Gelscheibchen in Dialyse-Schläuche elektrophorisiert.

11. Präparation der DNA zur Elektronenmikroskopie

Grids wurden nach der Droplet-Methode von LANG und MITANI (22) präpariert: mtDNA (Endkonzentration 0,1 µg/ml) wurde in eine Lösung gegeben mit 0,2 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA, 0,0003 % Cytochrom c und 0,2 % Formaldehyd pH 7,0. 40 µl-Droplets dieser Lösung wurden auf eine Teflon-Oberfläche pipettiert. Nach 15 min wurden Platingrids (mit Kollodium beschichtet, mit Kohle bedampft) kurz auf die Oberfläche getupft, danach 3 sec auf eine Wasseroberfläche (Abschwemmen überflüssigen Cytochrom c's), 12 sec mit 90 % igem Äthanol entwässert und auf Filterpapier getrocknet. Die Kontrastierung der DNA erfolgte durch Kegelbedampfung mit einer Platin-Iridium-Legierung.

12. Partielle Denaturierung der DNA

mtDNA wurde 10 min auf 48 °C (49 °C) erhitzt in einer Lösung, die 45 mM Natriumphosphat pH 7,0, 23,5 % Dimethylsulfoxid und 4,5 % Formaldehyd enthielt. Nach Abkühlung in Eis sofortige Präparation bei Zimmertemperatur wie unter 11. beschrieben.

13. Elektronenmikroskopie und Auswertung der Mikrografien

Die DNA-Präparate wurden mit einem Philips EM 301 Elektronenmikroskop bei einer Primärvergrößerung von 9100 x oder 11000 x fotografiert. Als Größenmaßstab diente ein Grating-Replica (54800 Linien pro 2,54 cm), das anschließend an jede Fotoserie ohne Umschaltung der Hochspannung fotografiert wurde.

Die Mikrografien wurden auf Papier projeziert (Vergrößerung 20 x), nachgezeichnet und die Längen der Moleküle mit einem Kartenmesser mit einer Genauigkeit von 0,3 % der Länge eines zirkulären Moleküls bestimmt.

14. Computer-Analyse

Die Daten der denaturierten Moleküle wurden mit einem Control Data 3300 Computer unter Benutzung der Algol-Sprache ausgewertet. Die Arbeitsweise des Computerprogramms ist in Abschnitt 6.5 der Ergebnisse dieser Dissertation erläutert.

ERGEBNISSE

1. Schwebedichten zweier DNA-Fraktionen, die mit Mitochondrien assoziiert sind

Die mtDNA von Neurospora läßt sich in vivo mit ^{3}H-Uracil markieren, das der wachsenden Kultur zugesetzt wird, von der Zelle in Thymidin umgewandelt und in die DNA eingebaut wird.

Werden Mitochondrien nach radioaktiver Markierung unter Verzicht auf eine DNase-Verdauung (siehe Methoden) isoliert und die aus ihnen gewonnene DNA im CsCl-Gradienten zentrifugiert, so erhält man nach Fraktionierung und Bestimmung der TCA-fällbaren Radioaktivität der Fraktionen eine zweigipflige Kurve (Abb. 1). Diese Präparation muß daher zwei DNA-Species unterschiedlicher Schwebedichten enthalten. Wird der gleiche Versuch nach DNase-Behandlung der Mitochondrien durchgeführt, bleibt nur die DNA bei der geringeren Schwebedichte erhalten. Diese DNA, die vor der DNase-Behandlung geschützt war, muß intramitochondrial lokalisiert sein, wodurch sie als die mitochondriale DNA (mtDNA) von Neurospora identifizierbar ist. Eine Überprüfung dieser Behauptung stellt die Übereinstimmung der Schwebedichte dieser DNA mit Literaturdaten dar (23). Während die mtDNA eine Schwebedichte von ρ = 1,701 g/ml (= 42 % G + C) hat, entspricht der Wert für die DNase-zugängliche DNA (ρ = 1,712 g/ml = 50 % G + C) dem der Kern-DNA.

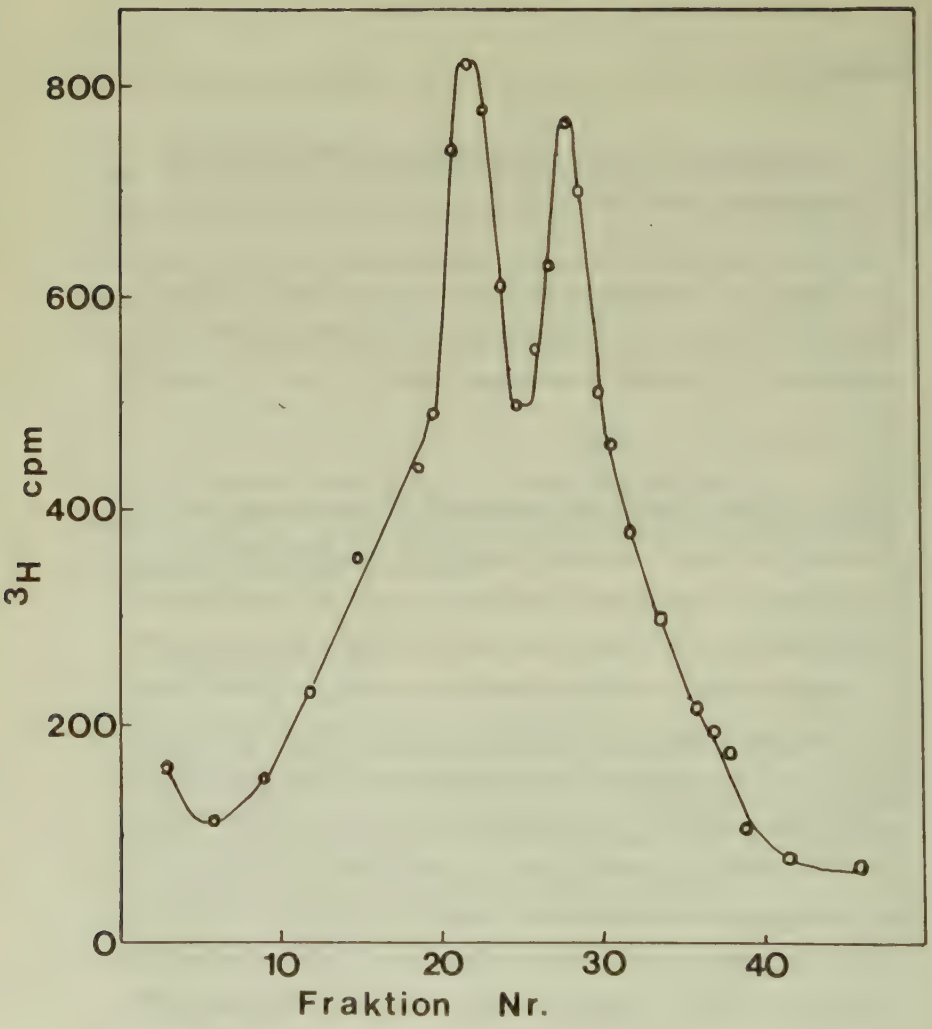

Abb. 1: CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation einer DNA-Präparation aus Mitochondrien, die nicht mit DNase behandelt worden sind. Das linke Maximum entspricht mit einer Schwebedichte von ρ = 1,712 g/ml der cytoplasmatischen DNA, das rechte mit ρ = 1,701 g/ml der mitochondrialen DNA.

Eine chemische Basenanalyse (siehe Methoden und Abb. 2) ergab für die mtDNA einen G+C-Gehalt von 40,0 ± 0,4 % (A = 29,5 %, T = 30,5 %, G = 19,9 %, C = 20,1 %).

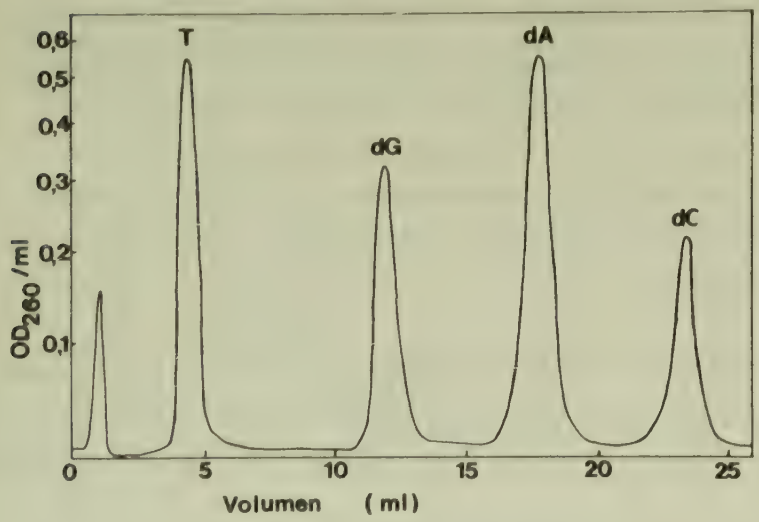

Abb. 2: Basenanalyse der mtDNA von Neurospora. Absorption der Nukleoside bei 260 nm nach Trennung über eine Ionenaustauscher-Säule.

Die mtDNA war Gegenstand des überwiegenden Teils dieser Untersuchung (Abschnitt 3 - 8). Im nachfolgenden Abschnitt 2 werden dagegen Daten diskutiert, die die DNase-zugängliche DNA (hier cytoplasmatische DNA, cytoDNA genannt) näher charakterisieren.

2. Längenverteilung cytoplasmatischer DNA

In verschiedenen Eukaryonten sind zirkuläre, im Cytoplasma lokalisierte Plasmide unbekannter Funktion gefunden worden (24-26). GUERINEAU et al. (27) beschrieben das korrelierte Auftreten bestimmter genetischer Marker mit derartigen Plasmiden in Hefe. Diese Daten und die Möglichkeit, daß ein Plasmid mit der mitochondrialen Außenmembran assoziiert ist, von wo seine Information als mRNA importiert werden könnte, rechtfertigten die Untersuchung der cytoDNA von Neurospora.

Mitochondrien wurden ohne DNase-Verdauung isoliert, cytoDNA und mtDNA im CsCl-Gradienten getrennt (siehe Abschnitt 1 und Abb. 1) und die cytoDNA zur Elektronenmikroskopie präpariert.

Abb. 3 zeigt eine Längenverteilung linearer cytoDNA-Moleküle. Zirkuläre Moleküle, wie sie für einen Plasmid zu erwarten wären, wurden nicht beobachtet. Die steile Begrenzung der Längenverteilung in Richtung zunehmender Konturlängen erlaubt die Interpretation, daß sich diese Moleküle durch Nuklease - Einwirkung von linearen oder zirkulären Molekülen einer Ausgangslänge von ca. 2 µm ableiten, was auch der Länge der in den oben genannten Arbeiten gefundenen Plasmide entspricht. Obwohl die Präparation keine DNA-Moleküle mit größerer Konturlänge als 20 µm enthielt, kann aber auch

die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß diese DNA chromosomaler Herkunft ist und sich durch intensive Nuklease-Einwirkung von hochmolekularer DNA ableitet.

Eine Lösung dieser Problematik, die z. B. durch Denaturierungskartierung oder durch Messung der Renaturierungskinetik möglich wäre, wurde in dieser Arbeit nicht angestrebt.

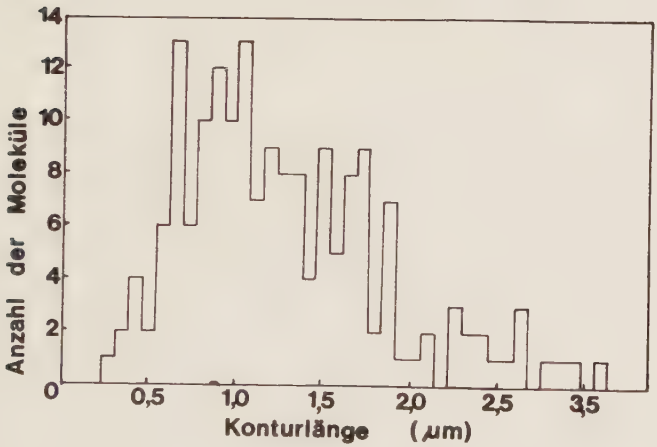

Abb. 3: Histogramm der Konturlängen cytoplasmatischer DNA.

3. Längenverteilung isolierter mtDNA

In elektronenmikroskopischen Präparationen osmotisch geschockter Mitochondrien aus Neurospora konnten - wie auch in Hefe (28) - doppelsträngige, ringförmig geschlossene mtDNA-Moleküle nachgewiesen werden (29). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß auch nach Isolation dieser DNA einige Moleküle ringförmig erhalten bleiben (30). Doch liegt der größte Teil isolierter mtDNA in Form linearer Fragmente vor (23), aus denen sich lineare Moleküle voller Länge anreichern lassen (16).

Diese Beobachtungen unterscheiden die mtDNAs von Neurospora und Hefe einerseits von den tierischen mtDNAs, die überwiegend zirkulär isolierbar sind (1), andererseits von der mtDNA des Protozoons Tetrahymena, die nicht nur in Präparationen, sondern vermutlich auch in vivo linear ist (31).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich der Anteil zirkulärer Moleküle durch Variation der Isolationsbedingungen erhöhen läßt. Dabei wurde von der Überlegung ausgegangen, daß eine Degradation der DNA vom ringförmigen Zustand zu linearen Fragmenten durch mechanische Einwirkung oder durch die Aktivität einer Mg^{2+}-abhängigen, endogenen Endonuklease (32) bedingt sein könnte.

Es wurden folgende Veränderungen des Isolationsvorganges (siehe Methoden) erprobt :

a) Abstoppen des Wachstums der Neurospora-Kultur durch Zugabe von 1 Volumen auf -5 °C vorgekühlten ETS-2-Puffer. Niedrige Temperatur und EDTA-abhängige Bindung divalenter Kationen sollten die genannte Endonuklease-Aktivität herabsetzen.

b) Verzicht auf DNase-Behandlung der Mitochondrien. Permanente Anwesenheit von EDTA.

c) Verhinderung mechanischer Einwirkungen auf die DNA durch Aufschluß der Mitochondrien mit Triton-X-100 (16) statt SDS + Phenol: Der Aufschluß mit SDS + Phenol erfordert mehrfaches Ausschütteln zweier Phasen (Phenol/Wasser) zur Abtrennung der Proteine. Die damit verbundenen Manipulationen werden beim Triton-X-100-Aufschluß vermieden.

d) Verzicht auf Ultrazentrifugationen als mögliche Quelle mechanischen Stresses.

e) Verzicht auf RNase- und Pronase-Behandlung der mtDNA, die als Quellen von DNase-Kontaminationen beschrieben worden sind (33).

Da unabhängig von diesen Variationen der Isolation nur ein Anteil von etwa 1 % aller DNA-Moleküle zirkulär vorlag, stellte sich die Frage, ob die lineare Form der mtDNA lediglich als Degradationsprodukt zu werten ist, oder ob mit der linearen Form eine physiologische Funktion verbunden ist. Antworten auf diese Fragestellung sollten die Verteilung der Längen der Fragmente und die Kartierung der Lage der Enden dieser Fragmente liefern.

Abb. 4 zeigt ein Histogramm der Konturlängen von 40 linearen Molekülen, aus dem hervorgeht, daß in allen Längenklassen Meßwerte auftreten und diese zwischen 0,1 und 19 µm liegen. Zwischen diesen Grenzwerten sind die Längen der Moleküle kontinuierlich verteilt, wie die Auftrennung der TCA-fällbaren Radioaktivität in einem linearen Sucrose-Gradienten verdeutlicht (Abb. 5).

Eine physiologische Funktion der linearen Fragmente sollte mit dem Auftreten bestimmter Größenklassen verbunden sein, die z. B. durch Selektion bestimmter Cistrons oder durch bevorzugte Schnitte an Initiationssequenzen der Replikation entstehen könnten. Das gefundene Ergebnis spricht dagegen für eine unspezifische Degradation der in vivo zirkulären DNA durch eine endogene Endonuklease (siehe auch Abschnitt 6.6).

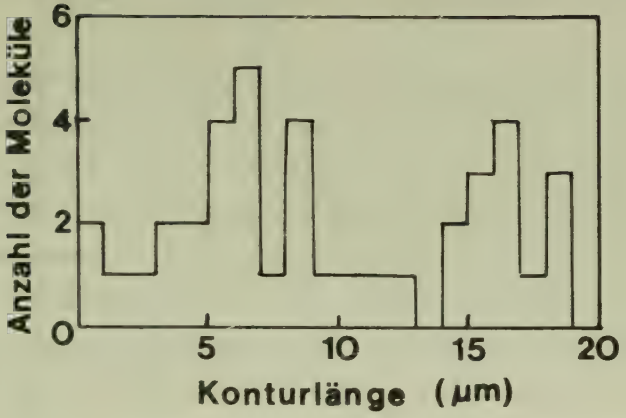

Abb. 4: Histogramm der Konturlängen von 40 linearen mtDNA-Molekülen

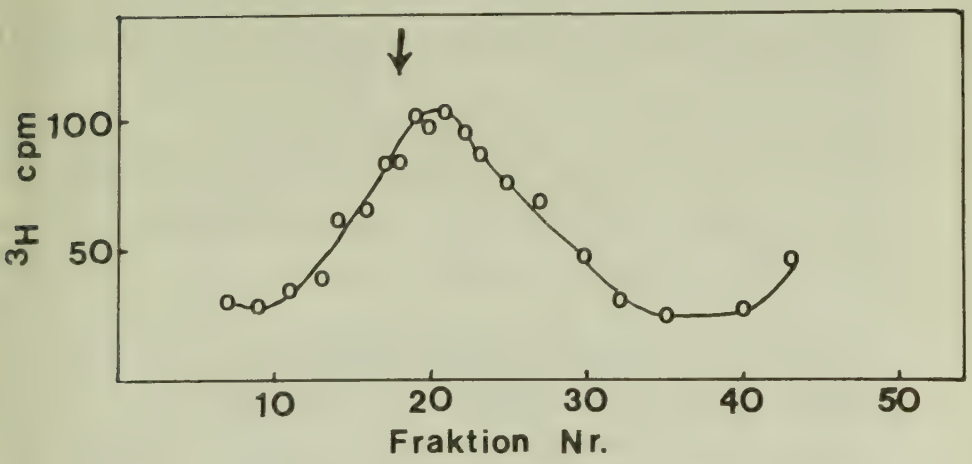

Abb. 5: Verteilung der TCA-fällbaren Radioaktivität einer mtDNA-Präparation im linearen Sucrose-Gradienten. Der Pfeil markiert die Position, in der ^{14}C-markierte DNA des Phagen λ (Molekulargewicht 31 x 10^6) in demselben Gradienten wanderte.

4. Elektronenmikroskopie der zirkulären mtDNA

Da die Elektronenmikroskopie die Untersuchung einzelner Moleküle ermöglicht, kann man mit ihren Methoden selektiv die zirkulären Moleküle bearbeiten und die linearen Fragmente aus der Untersuchung ausklammern. Dieses Vorgehen ist für die AT-Kartierung (Abschnitt 6.5) unbedingt notwendig, da diese Meßdaten sich erst nach Längennormierung einheitlicher Moleküle vergleichen lassen. In Abschnitt 7 und 8 wird erläutert, daß diese Beschränkung auf zirkuläre Moleküle nur ein Übergangsstadium der Untersuchung ist und eine weitere physikalische Kartierung mit der gesamten DNA-Präparation durchgeführt werden kann.

Abb. 6 zeigt das Histogramm der Konturlängen von 22 zirkulären mtDNA-Molekülen, deren mittlere Konturlänge 19,8 µm (= 41 x 10^6 Dalton; 1 µm = 2,07 x 10^6 Dalton (34)) betrug. Dieser Mittelwert stimmt hinreichend gut überein mit den Daten von mtDNA aus osmotisch geschockten Mitochondrien (29) sowie von mtDNA, die über einen CsCl/Ethidiumbromid-Gradienten vorgereinigt worden war (30).

Die Abb. 7 und 8 zeigen die Mikrographien zweier zirkulärer mtDNA-Moleküle. Das Molekül der Abb. 7 liegt in zirkulär kovalent geschlossener Form (circular covalently closed DNA = cccDNA) vor, in der alle bisher bekannten zirkulären DNA-

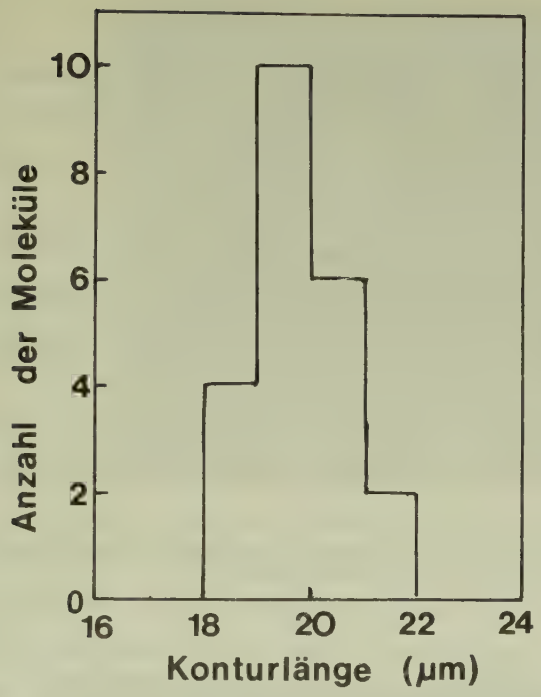

Abb. 6: Histogramm der Konturlängen von 22 zirkulären mtDNA-Molekülen. Mittlere Konturlänge: 19,8 ± 0,9 µm (= 41 x 10^6 Dalton)

Moleküle isoliert werden konnten. Die Superhelix-Windungen, d. h. die Verdrillung der Doppelstränge ineinander, bleiben bei dieser Form der DNA erhalten, da das Fehlen von Einzelstrangbrüchen das Aufwinden dieser Struktur verhindert. Ein oder mehrere solcher Einzelstrangbrüche, die vermutlich durch Nuklease-Einwirkung während der Aufarbeitung entstanden, haben zur offen zirkulären Form (open circular DNA = ocDNA) des Moleküls der Abb. 8 geführt. cccDNA- und ocDNA-Moleküle haben die gleiche Konturlänge. Allerdings wurden

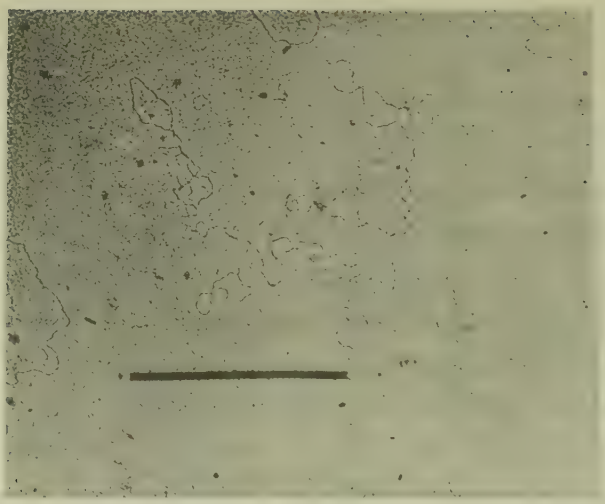

Abb. 7: Mitochondriale DNA (mtDNA) aus Neurospora crassa in zirkulär kovalent geschlossener Form (cccDNA). Der Strich hat eine Länge von 1 µm.

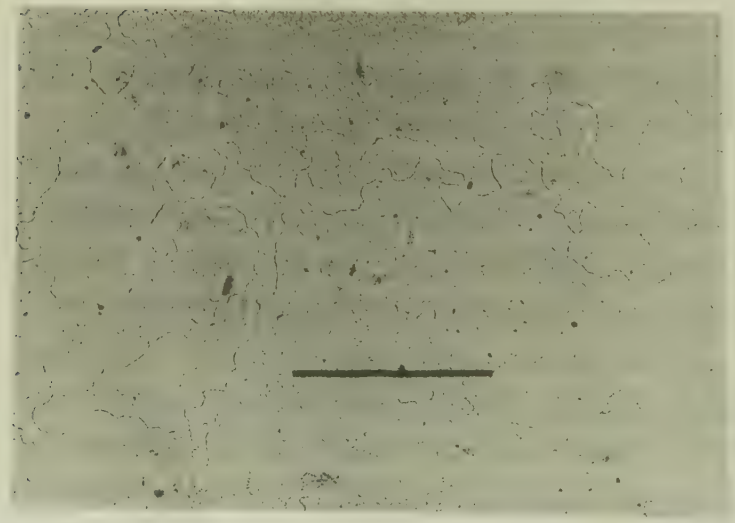

Abb. 8: Mitochondriale DNA (mtDNA) aus Neurospora crassa in offen zirkulärer Form (ocDNA). Der Strich hat eine Länge von 1 µm.

die Meßwerte der Abb. 6 überwiegend an ocDNA gewonnen, da die Verdrillung der cccDNA oft eine Ausmessung unmöglich macht.

Eine elektronenmikroskopische Präparation der mtDNA der extrachromosomalen Mutante "Poky" von Neurospora crassa ergab für 6 zirkuläre Moleküle eine mittlere Konturlänge von 19,3 $\pm$ 0,8 µm (= 40 x 10^6 Dalton). Dieser Wert unterscheidet sich nur um 2,5 % von dem des Wildtyps, wobei die Standardabweichungen überlappen.

Aufgrund dieses geringen Unterschiedes und der Tatsache, daß sich die Mutante "Poky" von einem anderen Wildtyp ableitet als der, mit dem diese Untersuchung durchgeführt wurde, ist keine weitergehende Charakterisierung der "Poky"-mtDNA angestrebt worden.

5. Kleine zirkuläre mtDNA

Der Stamm 5297 von Neurospora crassa enthält zirkuläre mtDNA-Moleküle der Längen 1 - 7 µm, deren Anteil an der gesamten mtDNA osmotisch geschockter Mitochondrien den der 20 µm-Ringe übersteigt. Dagegen wurde bei dem Stamm 5256, mit dem auch diese Arbeit durchgeführt wurde, nur ein solcher 'Mini-Ring" gefunden (29). Auch bei den Experimenten

dieser Arbeit wurden 8 solcher kleiner Ringe beobachtet (Konturlängen zwischen 5 und 8,8 µm). Das Verhältnis von diesen Ringen zu den 20 µm-Ringen betrug etwa 1 : 10. Da sich diese kleinen Ringe bei der partiellen Denaturierung wie cccDNA verhielten (siehe Abschnitt 6.4), kann über ihre Herkunft nichts gesagt werden: Ein Denaturierungsmuster hätte Information darüber geliefert, ob die Ringe untereinander gleiche Sequenzen enthalten, und ob sie aus einem stets gleichen Teil der 20 µm-Ringe aufgebaut werden.

6. Partielle Denaturierung

6.1. Allgemeine Aspekte der Charakterisierung einer DNA durch elektronenmikroskopische Abbildung des partiell denaturierten Moleküls

Die Doppelhelix-Struktur der DNA ist durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Adenin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin stabilisiert. Das Basenpaar AT ist mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen thermodynamisch weniger stabil als das Basenpaar GC mit drei Bindungen. Dies führt dazu, daß der Schmelzpunkt einer DNA um so niedriger liegt, je geringer ihr GC-Gehalt ist. Die Annahme liegt daher nahe, daß auch innerhalb eines DNA-Moleküls AT-reiche Sequenzen bei niedrigerer Temperatur aufschmelzen als

GC-reiche. Solche bevorzugt aufschmelzenden Sequenzen wurden erstmalig durch INMAN (35) in der DNA des Phagen λ nachgewiesen.

Im Gegensatz zur Messung von Schmelzkurven einer DNA befindet sich bei diesen Versuchen Formaldehyd im Reaktionssystem, der durch Reaktion mit NH_2-Gruppen die Renaturierungsreaktion inhibiert und die Zeit der Einwirkung einer erhöhten Temperatur zu einer Variablen des Denaturierungsvorgangs macht.

DNA läßt sich nach partieller Denaturierung elektronenmikroskopisch abbilden, fotografieren und ausmessen. Werden die Meßdaten mehrerer Moleküle verglichen, so läßt sich stets eine optimale Übereinstimmung der Muster nativer und denaturierter Regionen der Moleküle finden. Nach optimaler Reihung lassen sich die Moleküle in Abschnitte zerlegen. In jedem Abschnitt wird die Zahl der denaturierten Regionen aufsummiert und auf die Gesamtzahl der Moleküle bezogen. Das Ergebnis stellt eine Denaturierungskarte (AT-Karte) dar, mit der in ein vorher elektronenmikroskopisch nicht strukturiertes Molekül ein leicht reproduzierbares Muster eingeführt worden ist. AT-Karten wurden beispielsweise zur Kartierung von Deletionsmutationen (36) verwendet, zur Kartierung der Enden einer linearen DNA bei zirkulärer Permutation des Genoms (37), zur Bestimmung der Richtung von Replikation (38) und

Transkription (39) und zur Ermittlung der Verwandtschaft zwischen zwei verschiedenen Plasmiden(40). In einer "Petite"-Mutante von Hefe konnte mit dieser Methode die Amplifikation eines Teils des Genoms nachgewiesen werden (11).

Die relative Anordnung partiell denaturierter zirkulärer DNA-Moleküle zueinander ist problematisch, da Anfang und Ende der Moleküle nicht vorgegeben sind. Eine Anordnung, die empirisch gefunden wird, kann bereits die optimale Reihung darstellen. Es läßt sich jedoch nicht beweisen, daß mit dieser Reihung die quantitativ größte Übereinstimmung nativer und denaturierter Regionen gefunden ist. Die AT-Kartierungen in dieser Arbeit wurden deshalb mittels eines Computerprogramms berechnet, das von MAYER und PÜHLER (41) entwickelt worden ist.

Das Programm enthält die folgenden Schritte:

1. Eingabe aller Daten (Konturlängen der Doppel- und Einzelstrang-Regionen mit beliebigem Startpunkt und beliebiger Richtung).
2. Die Moleküle werden auf Einheitslänge normiert, indem die Länge jeder Region eines gegebenen Moleküls durch seine Gesamtlänge dividiert wurde.
3. Die normierten Moleküle wurden in 100 gleiche Abschnitte unterteilt. Ein Abschnitt, der den Beginn einer denaturierten Region enthielt, wurde als einzelsträngig, einer, der

den Beginn einer nativen Region enthielt, als doppelsträngig verarbeitet.

4. Die Moleküle wurden nach abnehmender Zahl denaturierter Regionen pro Molekül geordnet. Moleküle mit gleicher Zahl denaturierter Regionen wurden nach ansteigender Gesamtlänge einzelsträngiger DNA pro Molekül geordnet.

5. Das erste Molekül wurde an einer willkürlich gewählten Stelle geschnitten und in Tandem-Anordnung als Referenz-Karte verwendet.

6. Das zweite Molekül wurde in beiden Richtungen Abschnitt für Abschnitt mit der Tandem-Karte des ersten Moleküls verglichen und für jede Position der Wert der Übereinstimmung einzelsträngiger und doppelsträngiger Regionen ermittelt. Die beiden Moleküle wurden in der relativen Anordnung mit maximaler Übereinstimmung festgehalten.

7. Das dritte Molekül wurde entsprechend Schritt 6 mit einer Tandem-Karte, die aus den ersten beiden Molekülen berechnet wurde, verglichen, usw. ....

8. Die AT-Karte wurde durch Aufsummieren der Anzahl denaturierter Moleküle in jedem der 100 Abschnitte berechnet.

6.2. Partielle Denaturierung bei 48 °C

Abb. 9 zeigt ein zirkuläres mtDNA-Molekül nach partieller Denaturierung bei 48 °C. Wegen der geringen Zahl von Einzel-

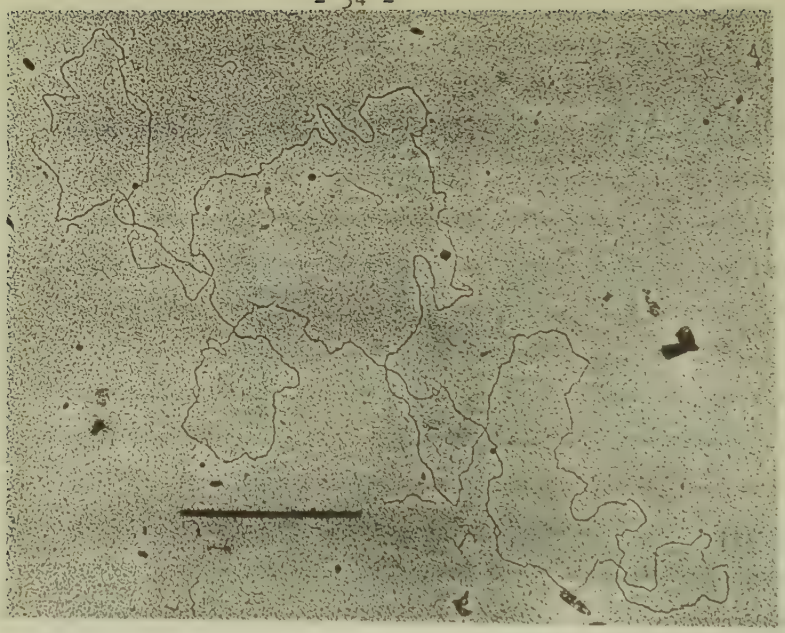

Abb. 9: mtDNA aus Neurospora crassa (offen zirkuläre Form) nach partieller Denaturierung bei 48 °C. Der Strich hat eine Länge von 1 µm.

strang-Regionen wurde nach Denaturierung bei dieser Temperatur keine AT-Karte berechnet. Doch enthält das abgebildete Molekül, dessen wenige und kleine denaturierte Regionen repräsentativ für alle Moleküle der Präparation waren, bereits eine wichtige Information: Da alle denaturierten Regionen kleiner als 1 % der Moleküllänge waren, kann die mtDNA von Neurospora keine längeren Sequenzen enthalten, die zu 95 - 100 % von den Basen Adenin und Thymin gebildet werden. Dagegen besteht etwa 15 % der Drosophila-mtDNA und etwa 50 % der Hefe-mtDNA aus solchen "nonsense"- oder "spacer"-Regionen, über deren Funktion nichts bekannt ist (8, 42).

6.3. Partielle Denaturierung bei 49 °C

Nach partieller Denaturierung bei 49 °C wurden etwa 7000 DNA-Moleküle durchgemustert und teilweise vermessen. Nach ihren physikalischen Eigenschaften lassen sie sich in 4 Gruppen einteilen, die in Tab. 1 zusammengefaßt sind. Während das Problem der kleinen zirkulären Moleküle hier nicht weiter weiter behandelt wird (siehe Abschnitt 5), gehen die folgenden Abschnitte 6.4 bis 6.6 auf die ersten drei Gruppen der Tabelle ein.

Tab. 1: Physikalische Eigenschaften isolierter mitochondrialer DNA nach partieller Denaturierung bei 49 °C

Molekül-Typ	Anzahl der ausgewerteten Moleküle	Konturlängen (µm)	Durchschnittl. Prozentsatz denaturierter Regionen
Lineare Moleküle	etwa 7000	0,1 bis 18,7	45
Große offen-zirkuläre Moleküle	31	18,7 ($\pm$ 1,2)	45
Große kovalent geschlossene zirk. Mol.	31	20,6 ($\pm$ 0,5)	$\leq$ 1
Kleine kov. geschl. Mol.	8	5,0 bis 8,8	$\leq$ 1

6.4. Das Verhalten von cccDNA bei partieller Denaturierung bei 49 °C

Nach Erhitzung auf 49 °C ließen sich die zirkulären Moleküle in zwei gleich große Gruppen einteilen. Eine Gruppe war (wie alle linearen Moleküle) zu etwa 45 % der Gesamtlänge denaturiert (Abschnitt 6.5), die andere Gruppe war gar nicht denaturiert oder enthielt nur ein bis fünf sehr kurze denaturierte Regionen, die zusammen weniger als 1 % der Moleküllänge ausmachten (Abb. 10). Es ist bekannt, daß cccDNA nicht demselben Verlauf der partiellen Denaturierung folgt wie lineare oder ocDNA, sondern durch ein Aufschmelzen kleiner, elektronenmikroskopisch nicht beobachtbarer Abschnitte der Doppelhelix die im Gegensinn gewundene Superhelix aufdrillt (43). Daher lassen sich die beobachteten überwiegend nativen Ringe als cccDNA interpretieren, auf die bereits im Abschnitt 4 eingegangen worden ist.

6.5. Partielle Denaturierung von ocDNA bei 49 °C

Abb. 11 zeigt die Mikrographie einer bei 49 °C partiell denaturierten DNA. Ihre Interpretation als ocDNA wird durch das prozentual gleich starke Aufschmelzen von linearer DNA sowie durch die Beobachtung von freien Einzelstrang-Enden gestützt. Der Anteil an denaturierten Regionen (meßbare Konturlänge) schwankte bei 19 Molekülen zwischen 25 und 50 %. Diese partiell denaturierten Moleküle waren im Mittel

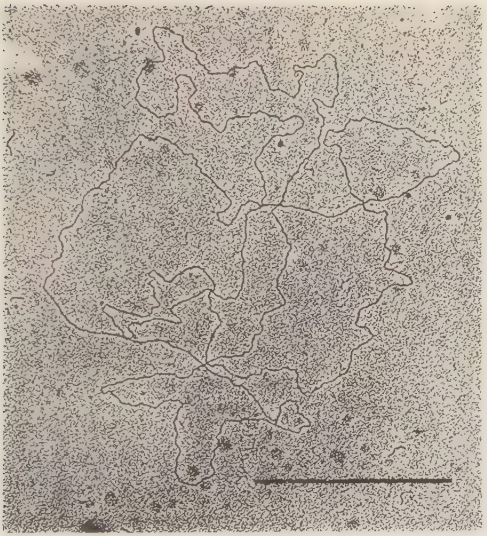

Abb. 10: mtDNA aus Neurospora crassa (in zirkulär kovalent geschlossener Form) nach Erhitzung auf 49 °C. Der Strich hat eine Länge von 1 µm.

kürzer als die cccDNA, vermutlich, weil eine gegebene DNA-Sequenz in Einzelstrang-Form elektronenmikroskopisch kürzer erscheint als eine Doppelstrang-DNA (44). Aus den Meßdaten wurde ein Korrekturfaktor von 1,14 für die Einzelstrang-Regionen berechnet, über den ein durchschnittlicher Prozentsatz von 45 % der denaturierten Regionen ermittelt wurde.

Abb. 12 zeigt das Denaturierungsmuster (Aufeinanderfolge denaturierter und nativer Regionen) von 19 graphisch linearisierten Ringen, die entsprechend abnehmender Gesamtkonturlänge angeordnet wurden. Die Moleküle wurden empirisch nach

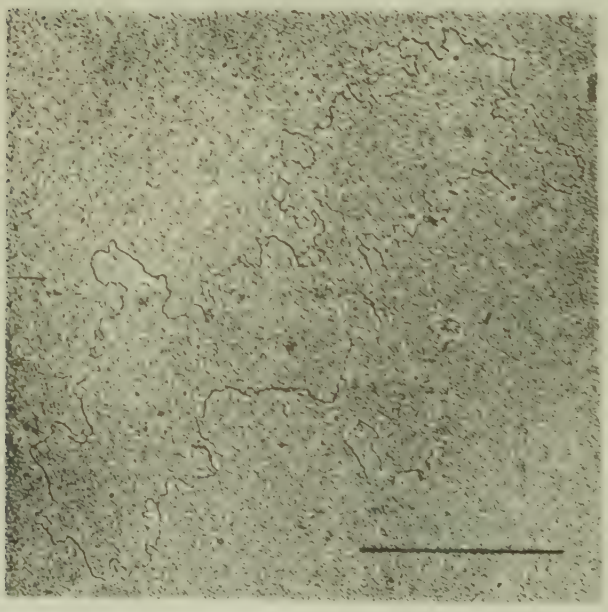

Abb. 11: mtDNA aus Neurospora crassa (in offen zirkulärer Form) nach partieller Denaturierung bei 49 °C. Der Strich hat eine Länge von 1 µm. Der obere Teil der Abbildung zeigt eine Nachzeichnung der Kontur desselben Moleküls.

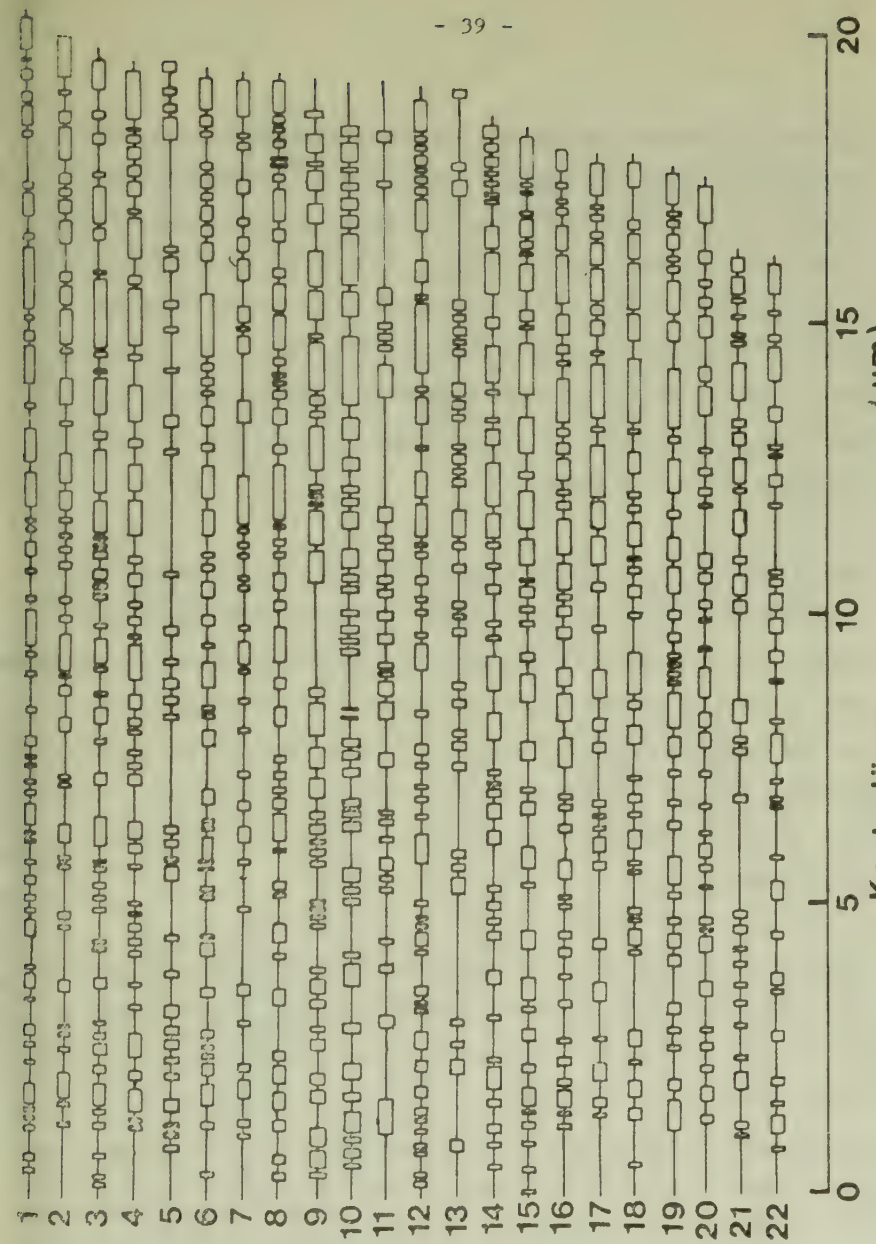

Abb. 12: Denaturierungsmuster von 19 graphisch linearisierten Ringen und drei linearen (Nr. 6, 8, 10) DNA-Molekülen nach partieller Denaturierung bei 49 °C.

optimaler Übereinstimmung des Denaturierungsmusters angeordnet. Das erhaltene Muster war hinreichend charakteristisch, um drei lineare Moleküle voller Länge zu erkennen und in die Anordnung einzubeziehen (Nr. 6, 8, 10), und sie von Fragmenten zu unterscheiden, die 5 % oder mehr der kartierten Sequenz verloren hatten. Die Moleküle zeigen eine deutliche Polarität mit einer großen nativen Region an dem (willkürlich gewählten) linken Ende und einer Gruppe langer denaturierter Regionen am rechten Ende.

Abb. 12 zeigt auch, daß die 22 Moleküle in ihrer gemessenen Konturlänge beträchtlich variieren. Die verhältnismäßig konstante Proportionalität der doppel- und einzelsträngigen Bereich legt jedoch nahe, daß diese Variation präparationsbedingt ist und nicht durch deletierte oder zusätzlich eingefügte Sequenzen zu erklären ist. Diese Variationen machen es schwierig, einander entsprechende native und denaturierte Regionen aufzusummieren.

Um eine unzweideutige Denaturierungskarte zu erhalten, wurden diese Daten mittels des Computerprogramms verarbeitet, das in Abschnitt 6.1 beschrieben worden ist. Das Ergebnis dieser Berechnung zeigt Abb. 13. Die Moleküle der Abb. 12 und 13 sind gleich numeriert und mit gleichem Anfang und Ende dargestellt. Die Abbildungen sind miteinander vergleichbar, wenn man die Normierung auf Einheitslänge berücksichtigt.

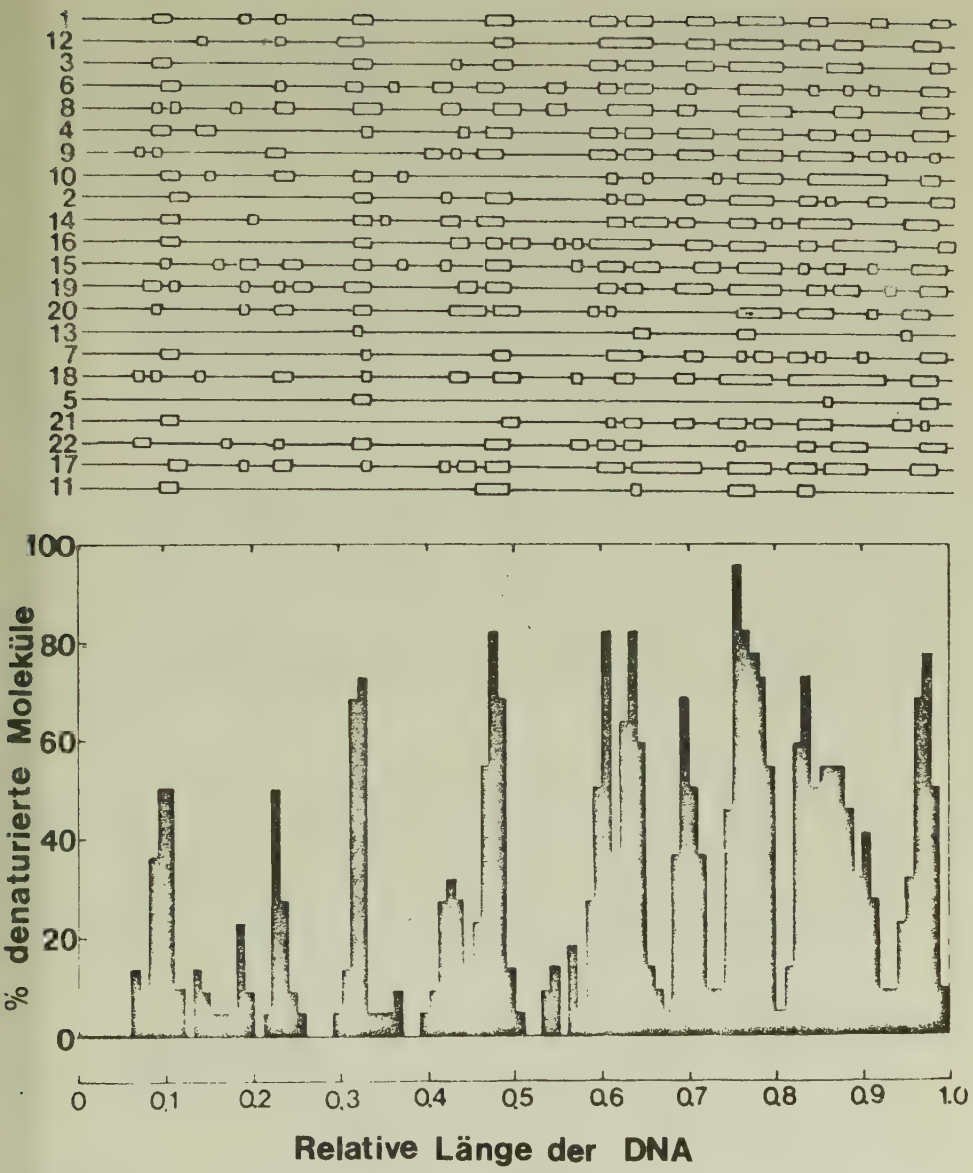

Abb. 13: Optimale Reihung und Aufsummierung der AT-Karte von 22 partiell denaturierten Molekülen (49 °C) durch den Computer. Numerierung der Moleküle und Lage der Enden wie in Abb. 12, aber Veränderung der Daten durch Längennormierung und Vernachlässigung denaturierter Regionen, die kürzer als 1 % der Gesamtlänge waren.

Zusätzlich wurden in Abb. 13 alle denaturierten Regionen, die kleiner als 1 % der Gesamtlänge des jeweiligen Moleküls waren, bei der Berechnung als nativ bewertet. Diese Zusatzannahme erniedrigte den Background, führte aber nicht zu einer veränderten Lage der Maxima.

Die Unterdrückung des Backgrounds stellt nicht so sehr eine optische Aufwertung, sondern eine qualitative Verbesserung der Denaturierungskarte dar. Das soll durch folgende Überlegungen erläutert werden:

1. Das Raster des Computerprogramms mit einer Auflösung von 100 Längeneinheiten pro Molekül ist gröber als die Genauigkeit der Ausmessung der Moleküle. Kleine native und denaturierte Regionen (1 ≤ 1 %) werden deshalb nicht sinnvoll verarbeitet und täuschen unspezifisches Aufschmelzen in den Minima der Denaturierungskarte vor.
2. Auch bei einer hinreichend feinen Auflösung durch den Computer können spezifisch aufgeschmolzene Regionen einen unspezifischen Background vortäuschen, da durch leichte ungleichmäßige Stauchungen und Streckungen des Moleküls einander entsprechende Regionen nicht unbedingt zur Deckung kommen müssen (40). Diese Gefahr besteht nach Selektion der Daten für große denaturierte Bereiche nicht, da diese Störungen der Abbildung des Moleküls hier nur eine leichte Verbreiterung der Denaturierungsmaxima bewirken können.

Das Gegenstück zu Abb. 13, eine Karte unter Berücksichtigung der kleinen denaturierten Regionen bei Auflösung von 100 Längeneinheiten pro Molekül, ist in dieser Arbeit nicht enthalten, da sie keine zusätzliche Information brächte. Doch lassen sich die obigen Behauptungen durch einen Vergleich von Abb. 13 mit Abb. 17 belegen. Abb. 17 wurde in einem späteren Stadium der Arbeit mit denselben Meßwerten erhalten, als eine Verbesserung des Computerprogramms es ermöglichte, mit 300 Informationseinheiten pro Molekül zu rechnen: Alle Maxima der Abb. 13 bleiben erhalten; wenige zusätzliche Maxima, die sich von kleinen denaturierten Regionen herleiten, sind erkennbar; und ein vorher fehlender Background ist vorhanden.

6.6. Anordnung partiell denaturierter linearer Moleküle relativ zur zirkulären AT-Karte.

Eine erste Anwendung der AT-Karte war möglich, indem lineare, partiell denaturierte Moleküle relativ zu ihr angeordnet wurden (Abb. 14). Aus Abb. 13 ist es bereits ersichtlich, daß die drei linearen Moleküle 6, 8 und 10 sich durch je einen Doppelstrangbruch an drei verschiedenen Stellen von den Ringen ableiten. Abb. 14 zeigt zusätzlich 11 kleinere Fragmente (Konturlängen $> 11{,}2\ \mu m$), die sich durch je zwei Doppelstrangbrüche von den Ringen ableiten.

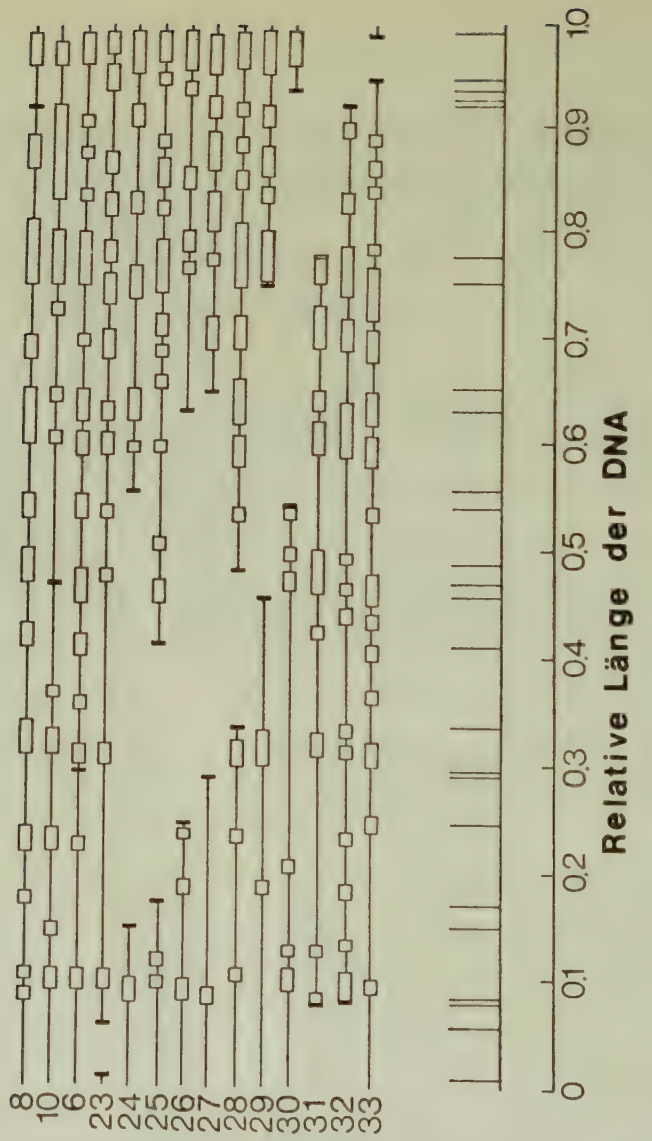

Abb. 14: Anordnung von 14 linearen, partiell denaturierten Molekülen (49 °C) relativ zu der AT-Karte der Abb. 13 (ohne Verwendung des Computers). Denaturierte Regionen, die kleiner als 1 % der Länge eines Ringes waren, wurden vernachlässigt. Die Enden der Moleküle sind auf der Abszisse gekennzeichnet.

Die so kartierten 25 Bruchstellen zeigen, daß die zirkuläre DNA während der Isolation unspezifisch fragmentiert wird, da keinerlei Häufungen auftreten. Damit wird eine physiologische Funktion des Übergangs von zirkulären zu linearen Molekülen unwahrscheinlich.

7. Spaltung der mtDNA durch die Restriktionsendonuklease Eco R I

7.1. Die Verwendung von Restriktionsenzymen zur DNA-Kartierung

Der Begriff "Restriktionsenzym" wird auf bakterielle Endonukleasen angewendet, die eine (für jedes Enzym andere) spezifische Basensequenz einer DNA erkennen und spalten (45). Eine DNA, die mehrere dieser spezifischen Basensequenzen enthält, wird in definierte Fragmente geschnitten, die sich meist in ihrer Länge unterscheiden und so charakterisieren und trennen lassen. Die Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der relativen Anordnung solcher Fragmente hat die Verwendung von Restriktionsenzymen innerhalb weniger Jahre zur erfolgreichsten Methode der physikalischen Kartierung von Genomen werden lassen.

In dieser Arbeit wurde die Endonuklease Eco R I verwendet, die das rotationssymmetrische Hexanukleotid $\overset{\downarrow}{\text{...GAATTC...}}$ (46) $\underset{\uparrow}{\text{...CTTAAG...}}$ innerhalb einer DNA erkennt und an den gekennzeichneten Stel-

len spaltet. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieser relativ langen Sequenz ist so gering, daß mit DNA-Fragmenten zu rechnen war, die eine für elektronenmikroskopische Charakterisierung hinreichende Länge haben.

7.2. Charakterisierung der Eco R I - Fragmente der mtDNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese und elektronenmikroskopische Konturlängenmessung

In der Agarose-Gel-Elektrophorese wird lineare DNA entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Abb. 15 zeigt das Ergebnis einer solchen Elektrophorese der mtDNA vor und nach Spaltung mit Eco R I. Die Abwesenheit definierter Banden in der unbehandelten Probe (Gel 2) bestätigt das frühere Ergebnis, daß zirkuläre mtDNA während der Isolation unspezifisch degradiert wird (Abb. 4 und 5). Es ist jedoch zu erwarten, daß nicht nur die wenigen intakten Ringe, sondern auch größere unspezifische Fragmente durch das Restriktionsenzym in spezifische Fragmente gespalten werden. Entsprechend dieser Erwartung zeigt die Eco R I behandelte Probe (Gel 4) 11 scharfe Banden, die durch die Buchstaben A bis K nach abnehmender Größe (= zunehmender Beweglichkeit im Gel) bezeichnet wurden (47). Eine elektronenmikroskopisch bestimmte Längenverteilung dieser DNA-Präparation (Abb. 16) enthält vier Maxima im Konturlängenbereich zwischen 1,5 und 7 µm, die Molekulargewichten von 14, 7,7, 6,1 und 3,4 x 10^6 ent-

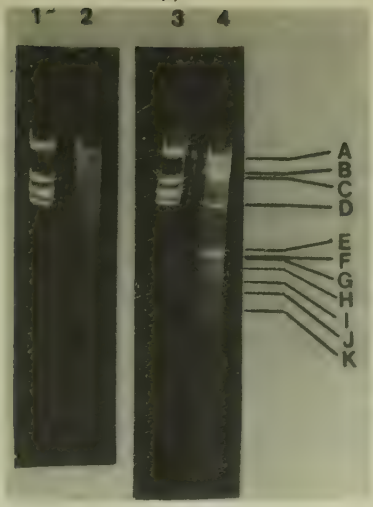

Abb. 15: Agarose-Gel-Elektrophorese von mtDNA vor (Gel 2) und nach (Gel 4) Behandlung mit Eco R I. Die Fragmente F und G konnten im Gel als getrennte Banden erkannt werden, was in der Fotografie nicht zum Ausdruck kommt. Eco R I-Fragmente von λ-DNA wurden als Standard benutzt (Gel 1 und 3). Gel 1 enthält zwei Banden teilweise verdauten Materials zwischen den oberen beiden Hauptbanden.

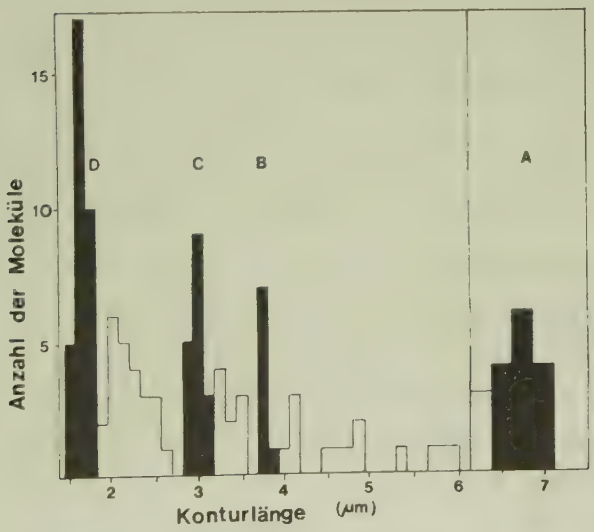

Abb. 16: Histogramm der Konturlängen von Eco R I-gespaltener mtDNA. Nur Fragmente größerer Länge als 1,5 µm sind gezeigt. Die Balkenbreite links der senkrechten Linie beträgt 0,14 µm, rechts 0,28 µm. Die schwarzen Bereiche wurden zur Berechnung der Längen von Fragment A bis D der Tab. 2 benutzt.

sprechen. Molekulargewichte dieser Größenordnung lassen sich für die spezifischen Fragmente A bis D aus dem Vergleich mit Literaturdaten für die Banden der Eco R I-verdauten λ-DNA erwarten (48). Das Ergebnis zeigt, daß sich diese vier spezifisch geschnittenen Fragmente der mtDNA elektronenmikroskopisch erkennen lassen, doch überlagert sich den Maxima der Fragmente, die kleiner sind als A, ein Background unspezifisch geschnittener Fragmente.

Die Genauigkeit der elektronenmikroskopischen Abbildung und Ausmessung von DNA ist nicht groß genug, um die Fragmente E bis K in einem Histogramm als getrennte Maxima erkennen zu lassen. Die Konturlängen dieser Fragmente wurden deshalb nach Herausschneiden der Banden und elektrophoretischer Herauslösung der DNA bestimmt. Die Meßwerte für die Molekulargewichte aller Fragmente enthält Tabelle 2. Die Korrektheit dieser Daten läßt sich durch Auftragung der elektronenmikroskopisch bestimmten Molekulargewichte (unter Einbezug der Literaturdaten für die Eco R I-gespaltene λ-DNA) gegen die elektrophoretische Beweglichkeit überprüfen (Abb. 17). Die Tatsache, daß die Summe der Molekulargewichte aller Fragmente dem Molekulargewicht der zirkulären DNA entspricht, stellt einen Beweis für die vollständige Beschreibung aller Fragmente dar und zeigt, daß die Fragmente Derivate nur einer DNA-Species sind.

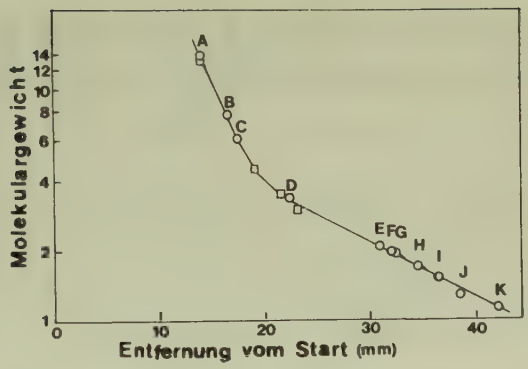

Abb. 17: Beweglichkeit der Eco R I-Fragmente der mtDNA (o) und der λ-DNA (□) in Abhängigkeit von den elektronenmikroskopisch bestimmten Molekulargewichten.

Tab.2: Durchschnittliche Molekulargewichte der zirkulären mtDNA und der Eco R I-Fragmente der mtDNA

Molekül-Typ	Anzahl der ausgewerteten Moleküle	Molekulargewichte ($\times 10^6$)
zirkuläre DNA	22	41,0 ± 1,9
Fragmente:		
A	14	14,0 ± 0,4
B	8	7,7 ± 0,1
C	17	6,1 ± 0,2
D	32	3,4 ± 0,2
E	13	2,1 ± 0,1
F + G	16	2,0 ± 0,1 (2x)
H	12	1,7 ± 0,1
I	14	1,5 ± 0,1
J	16	1,3 ± 0,1
K	21	1,1 ± 0,1
		42,9 ± 0,6

8. Partielle Denaturierung der Eco R I-gespaltenen mtDNA und Lokalisation der Fragmente relativ zu der AT-Karte der zirkulären DNA

Aufgrund der Länge der Fragmente A bis D der Eco R I-gespaltenen mtDNA lag die Vermutung nahe, daß ihr Denaturierungsmuster informationsreich genug sein würde, um sie relativ zu der AT-Karte der zirkulären DNA anzuordnen.

Nach partieller Denaturierung der gesamten Eco R I-gespaltenen Probe bei 49 °C ergab sich ein Histogramm der Konturlängen aller Fragmente entsprechend Abb. 16. Die Maxima waren um etwa 10 % in Richtung geringerer Konturlängen versetzt, was aus dem Verhalten einzelsträngiger DNA bei elektronenmikroskopischer Präparation zu erwarten war (siehe Abschnitt 6.5).

Alle Moleküle, deren Länge in das Maximum A fiel, zeigten ein einheitliches Denaturierungsmuster, ebenso wie 80 - 90 % der Moleküle der Maxima B, C und D. Diese Maxima enthielten jedoch auch 10 - 20 % solcher DNA, die sich - wie aus dem Denaturierungsmuster ersichtlich war - durch unspezifische Degradation von den jeweils größeren Fragmenten ableiteten. Diejenigen Daten, die sich auf diese Weise eindeutig selektieren ließen, wurden in die weitere Auswertung nicht einbezogen. Ihre Entstehung läßt sich durch unspezifische Schnitte in der DNA vor dem Einwirken des Restriktionsenzyms erklären.

Mit Hilfe des Computerprogramms zur Auswertung zirkulär permutierter DNA (Abschnitt 6.1) wurden die spezifisch geschnittenen Fragmente des Maximums A relativ zueinander angeordnet, ebenso die der Maxima B, C und D. Das geschah, um zu prüfen, ob der Computer die Enden der Fragmente, die er nicht kennt, in derselben Position anordnet. Der positive Ausgang, den dieses Rechenexperiment hatte, bewies, daß die Methode der partiellen Denaturierung in Verbindung mit maschineller Datenverarbeitung geeignet ist, die Spezifität der Schnitte des Restriktionsenzyms zu beweisen.

Abb. 18 zeigt den Vergleich der Denaturierungskarten, die aus diesen Anordnungen berechnet wurden, mit der Karte des gesamten Genoms. Die Karte der zirkulären Moleküle wurde in diesem Fall nach einer Verbesserung des Computerprogramms mit 300 Informationseinheiten pro Molekül gerechnet. Diese Feinheit der Auflösung entspricht der Genauigkeit der Ausmessung der Mikrografien.

Nach einer Stauchung der Karte von Fragment A um 5 % - Schwankungen in dieser Größenordnung sind durch Präparation und elektronenmikroskopische Abbildung bedingt - war Fragment A aufgrund detailreicher Übereinstimmungen eindeutig anzuordnen. Der Vergleich der Karten ermöglicht es, die Enden von Fragment A mit einer Genauigkeit von 1 - 2 Längeneinheiten der Gesamtkarte (was etwa 0,5 % entspricht) zu lokalisieren.

Abb. 18 zeigt die Karten von Fragment C und D ebenfalls um 5 % ihrer Länge gestaucht, wogegen die Karte von Fragment B um 5 % ihrer Länge gespreizt wurde, um entsprechende Maxima und Minima zur Deckung zu bringen.

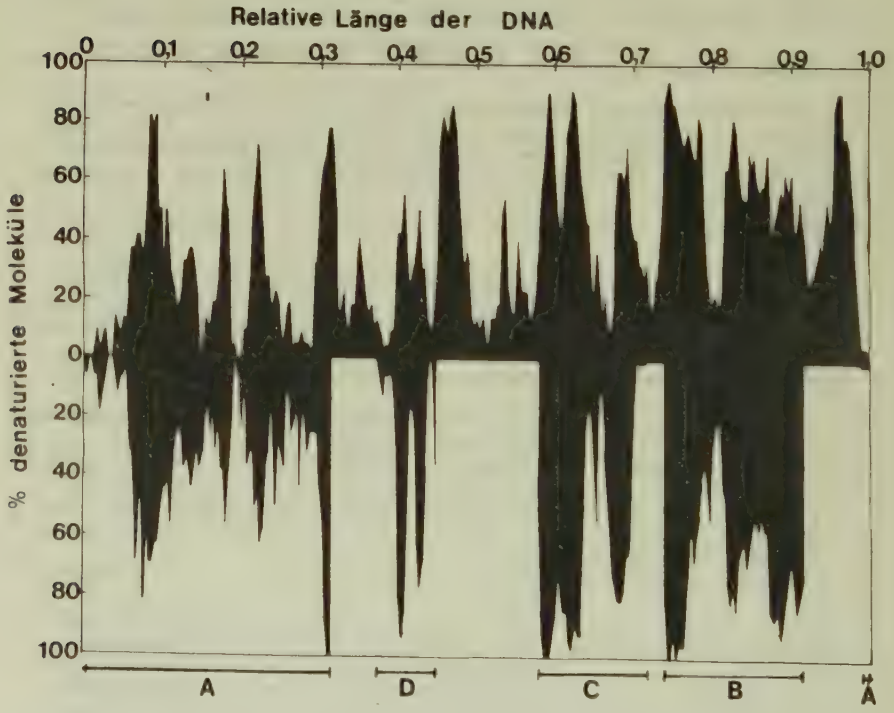

Abb. 18: AT-Karten der zirkulären mtDNA (300 Informationseinheiten pro Einheitslänge; von der Basislinie nach oben aufgetragen) und der Eco R I-Fragmente A bis D der mtDNA (nach unten aufgetragen). Die Meßwerte der zirkulären DNA sind identisch mit denen der Abb. 12 und 13. Die AT-Karten der Fragmente beruhen auf je 15 bis 20 ausgemessenen Molekülen.

Die AT-Karten der Fragmente B, C und D wurden mit der AT-Karte der zirkulären Moleküle überlagert. Bei diesem Vergleich ergaben sich Alternativanordnungen, die Ähnlichkeiten der Verteilung der Maxima und Minima zwischen den Karten zeigten. In diesen Fällen wurde diejenige Position des Fragments relativ zu der Karte ermittelt, in der die beiden AT-Karten die geringsten Abweichungen voneinander zeigten. Das geschah durch Auszählen nicht übereinstimmend abgedeckter Flächeneinheiten der AT-Karte des jeweiligen Fragments und der AT-Karte der zirkulären DNA.

Die Abb. 18 gibt diese so ermittelte Anordnung der Fragmente wieder.

Erst eine Weiterentwicklung des Computerprogramms wird es ermöglichen, die Daten jedes einzelnen Fragments mit der Gesamtkarte zu vergleichen und die postulierte Anordnung zu bestätigen oder zu modifizieren.

DISKUSSION

Während die Isolation intakter - linearer oder zirkulärer - DNA aus Phagen, Bakterien (Plasmide) oder tierischen Mitochondrien im allgemeinen unproblematisch ist, führten entsprechende Methoden bei mitochondrialer DNA von Neurospora zu längenheterogener linearer DNA (23). Trotz dieser Schwierigkeit konnte durch Messung der Renaturierungskinetik (49) oder durch elektronenmikroskopische Längenmessung linearer Moleküle (16) die Größe dieser mtDNA in vivo und damit ihr potentieller Informationsgehalt in Näherung bestimmt werden. Kurz vor Aufnahme der Experimente zu dieser Dissertation wurde gezeigt, daß in vivo zirkuläre, kovalent geschlossene Moleküle dieser DNA mit einem Molekulargewicht von 40×10^6 existieren (29).

Vor diesem Hintergrund sollte eine Antwort auf die Frage nach den Ursachen für die Linearisierung der DNA während der Isolation gefunden werden. Das wesentliche Ziel der Arbeit war eine Kartierung der DNA, obwohl ihre Degradation eine große Zahl der zum Erreichen dieses Ziels verwendbaren Methoden ausschloß oder auszuschließen schien.

1. Die Degradation der zirkulären mtDNA

Nach Angaben von SCHAFER et al. (16) läßt sich aus der mtDNA von Neurospora eine Fraktion linearer DNA - Moleküle relativ

einheitlicher Länge isolieren. Dieses Ergebnis legte Spekulationen über eine physiologische Funktion dieser DNA nahe, deren experimentelle Klärung den Nachweis bevorzugter Längen und bevorzugter Lagen der Enden der Moleküle verlangte.

Mit drei Methoden - Messung des Sedimentationsverhaltens im linearen Sucrose-Gradienten, Konturlängenmessung im Elektronenmikroskop und Verteilung in der Agarose-Gel-Elektrophorese - konnte nachgewiesen werden, daß in nicht fraktionierter mtDNA keine bevorzugten Moleküllängen existieren. Das Ergebnis der zitierten Arbeit kann durch bevorzugte Pelletierung hochmolekularer DNA erklärt werden.

Die statistische Verteilung der Enden dieser linearisierten Fragmente konnte durch zwei Methoden verdeutlicht werden: Die direkte Kartierung der Molekülenden zeigt keinerlei Übereinstimmungen. Die spezifische Fragmentierung der DNA durch Restriktionsenzyme, die die spätere Kartierung der DNA ermöglichte, zeigte einen unspezifischen Background, der sich dadurch erklären läßt, daß im Bereich jedes spezifischen Fragments vor Einwirken des Restriktionsenzyms bereits statistisch verteilte Schnitte existierten.

Insgesamt ergibt sich das Bild, daß die endogene Endonuklease der Mitochondrien (32) durch alle gewählten Vorsichts-

maßnahmen nicht inhibierbar ist, möglicherweise deshalb, weil trotz äußerer EDTA-Zugabe in den Mitochondrien divalente Kationen, die für die Aktivität des Enzyms notwendig sind, weiter zur Verfügung stehen.

Diese Ableitung linearer von zirkulärer mtDNA in Neurospora entspricht ähnlichen Beobachtungen an Saccharomyces carlsbergensis (50). Dagegen spricht die Feststellung einer terminal invers duplizierten Sequenz in der mtDNA von Tetrahymena für die Existenz linearer mtDNA in diesem Organismus in vivo (31).

2. AT-Kartierung der zirkulären mtDNA

Die Methode der elektronenmikroskopischen Abbildung von DNA nach partieller Denaturierung ermöglicht eine Kartierung AT-reicher Sequenzen (55) und wurde mit diesem Ziel bisher in drei Fällen auf mtDNA angewandt (8, 50, 51). Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Publikationen mit der mtDNA von Neurospora aufgrund dieser Daten ist jedoch wegen der unterschiedlichen Längen der DNAs und Unterschieden in der Methodik nur beschränkt möglich.

Die partielle Denaturierung der mtDNA aus Drosophila ermöglichte die Entdeckung einer AT-reichen Sequenz, die 25 % des Genoms ausmacht. Etwa 60 % dieser Region besteht vermutlich aus einer reinen AT-Sequenz, die ein Molekularge-

wicht von etwa 2×10^6 hat.(8). Es erscheint vernünftig, das Fehlen einheitlich aufgeschmolzener Regionen auch nur annähernd dieser Länge in der mtDNA von Neurospora nach partieller Denaturierung bei 48 °C als Fehlen einer solchen AT-Sequenz zu interpretieren. Doch ist keine geeichte Korrelation zwischen dem AT-Gehalt aufgeschmolzener Bereiche und den Denaturierungsbedingungen, die in dieser Arbeit angewandt wurden, publiziert worden.

Die partielle Denaturierung von Ratten-mtDNA ermöglichte eine Kartierung von drei bevorzugt aufschmelzenden Regionen (51). Bevorzugt aufschmelzende Regionen konnten auch in der mtDNA von Saccharomyces carlsbergensis kartiert werden (50). Diese Karte kann aber nicht als zweifelsfrei zirkulär permutiert erkannt werden, vermutlich, weil von Fragmenten ausgegangen wurde und diese nicht als zirkulär geschlossen verarbeitet und nicht normiert wurden.

Abb. 12 und 13 verdeutlichen die Notwendigkeit, von vollständigen Molekülen auszugehen: Stauchungen und Streckungen der DNA ermöglichen den Vergleich homologer Regionen erst nach Längennormierung, die bei Fragmenten nicht möglich ist.

Die Verwendung des beschriebenen Computerprogramms garantiert die optimale Anordnung aller denaturierten Moleküle entsprechend dem beschriebenen Entscheidungsverfahren.

Abb. 17 zeigt eine Denaturierungskarte, zu deren Berechnung die Moleküle auf Einheitslänge normiert wurden und keine Veränderung der Daten vorgenommen wurde. In dieser Karte zerfällt die Einheitslänge in 300 Informationseinheiten, wodurch die Auflösung jedes Moleküls durch den Computer genau so groß war wie die der Ausmessung der Mikrografien. Die Karte der Abb. 13 stellt jedoch schon eine gute Näherung dar, obwohl hier denaturierte Regionen, die kleiner als 1 % waren, nicht in die Auswertung eingingen.

Beide Karten zeigen, daß das gewählte Auswertungsverfahren aufgeschmolzene Bereiche in zahlreiche scharf begrenzte Maxima ordnet, die einen Beweis für die spezifische Denaturierung der DNA darstellen.

Der Informationsreichtum der Denaturierungskarte legte den Versuch nahe, spezifische Fragmente dieser DNA aufgrund ihres Denaturierungsmusters relativ zu dieser Karte anzuordnen.

3. Die Fragmentierung der mtDNA mit Hilfe des Restriktionsenzyms Eco R I

Restriktionsenzyme konnten bisher in drei Publikationen zur Charakterisierung von mtDNA eingesetzt werden.

HUTCHINSON et al. benutzten das Muster, in dem spezifische Fragmente von Pferd- und Esel-mtDNA in Elektrophoresen wanderten, als Fingerprint zum Nachweis der Herkunft der mtDNA in Pferd x Esel - Kreuzungen und wiesen damit die mütterliche Vererbung der mtDNA in Säugern nach (52).

Die mtDNA verschiedener Säugerarten wird durch Eco R I in 2 - 3 verschiedene Fragmente gespalten. Der Initiationspunkt der Replikation ist jeweils auf nur einem Fragment lokalisiert, auf dem auch die Richtung der Replikation bestimmbar ist (53, 54).

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten hatte die Untersuchung der mtDNA von Neurospora die Entwicklung einer Fragmentkarte zum Ziel. Es wurde erstmalig gezeigt, daß auch aus einer unspezifisch degradierten DNA-Präparation spezifische Fragmente erhalten werden können. Die Spezifität der Schnitte, die gleich lange Fragmente begrenzen, war nach partieller Denaturierung dadurch beweisbar, daß der Computer die Enden der Fragmente in gleicher Position relativ zueinander anordnete, obwohl die Daten als zirkulär permutiert vorgegeben waren.

Die Denaturierungskarten dieser spezifisch gespaltenen Fragmente müssen allen dargelegten Überlegungen zufolge Ausschnitte der Karte der zirkulären DNA darstellen.

Abb. 18 zeigt, daß das größte Fragment A aufgrund seines Denaturierungsmusters dem zirkulären Genoms eindeutig zugeordnet werden kann. Damit wurde die Methode der partiellen Denaturierung erstmalig zur Identifizierung von Restriktionsfragmenten und zur Aufstellung einer "Fragmentkarte" angewendet. Andererseits zeigt die Arbeit aber auch die Grenzen der gewählten Methode: Für die Fragmente B, C und D lassen sich zwar diejenigen Positionen relativ zur AT-Karte der zirkulären Moleküle bestimmen, bei denen die größten Übereinstimmungen bestehen, doch gibt es alternative Anordnungen, die allerdings eine erheblich geringere Wahrscheinlichkeit haben.

Abb. 19 faßt die Daten der partiellen Denaturierung und Fragment-Kartierung schematisch zusammen: Alle Regionen der zirkulären DNA (Abb. 18), die in wenigstens 50 % aller Moleküle aufgeschmolzen sind, wurden als AT-reich gekennzeichnet. Die wahrscheinlichsten Positionen von Fragment A bis D wurden markiert. Diese vier Fragmente umfassen 75 % der zirkulären DNA, die durch diese Angaben kartiert werden konnten.

Es ist beabsichtigt, die vorgeschlagene Fragmentkarte durch folgende Versuche zu überprüfen und zu ergänzen:

1. Anordnung jedes einzelnen Fragments relativ zur Gesamt-

karte mit Hilfe eines erweiterten Computerprogramms.

2. Spaltung der DNA mit anderen Restriktionsenzymen und Kartierung der denaturierten Fragmente.

3. Fragmente, die durch Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen erhalten wurden, sollten überlappende Sequenzen haben. Die Ergebnisse der Denaturierungskartierung lassen sich dann durch Doppelverdauung der DNA mit zwei Restriktionsenzymen überprüfen.

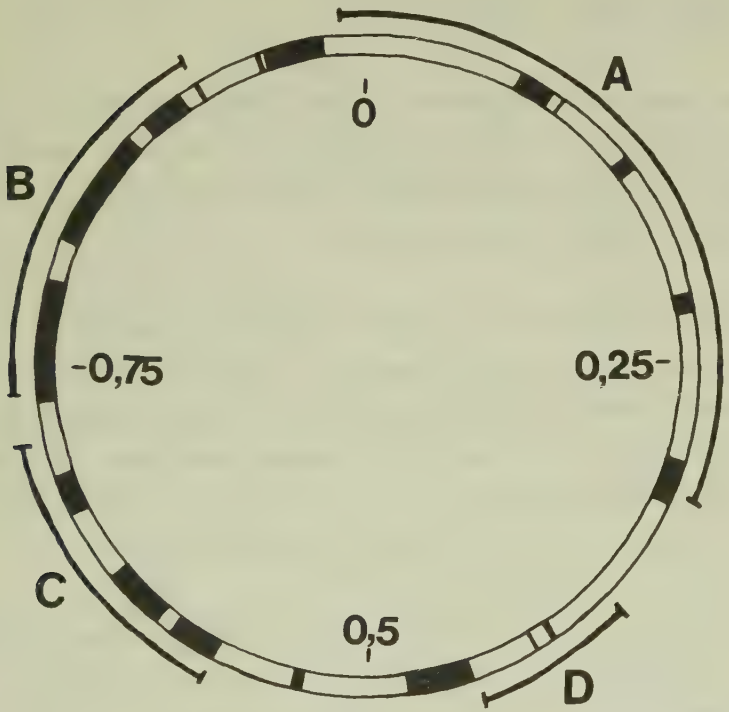

Abb. 19: AT- und Fragment-Karte der mitochondrialen DNA von Neurospora. Die Zahlen markieren die Positionen der Einheitslänge der linearisierten AT-Karte. Schwarz sind die Bereiche gezeichnet, die in wenigstens 50 % der Moleküle aufgeschmolzen sind (Abb. 18). Die Positionen der Eco R I-Fragmente A bis D sind gekennzeichnet.

ZUSAMMENFASSUNG

Präparationen der mitochondrialen DNA von Neurospora crassa bestehen überwiegend aus linearen, längenheterogenen Molekülen und enthalten nur etwa 1 % Ringe mit einem Molekulargewicht von 41 x 10^6. Durch partielle Denaturierung, elektronenmikroskopische Ausmessung und Computer-Auswertung der Meßwerte von 22 Molekülen voller Länge kann eine Denaturierungskarte erhalten werden, die eine asymmetrische Verteilung AT-reicher Regionen enthält.

Eine gleichartige Auswertung linearer Fragmente zeigt, daß diese sich durch statistisch verteilte Schnitte - vermutlich durch eine nicht inhibierbare endogene Endonuklease - von den zirkulären Molekülen ableiten.

Die DNA wurde durch die Restriktionsendonuklease Eco R I in 11 spezifische Fragmente gespalten, die durch Agarose-Gel-Elektrophorese und Elektronenmikroskopie unterschieden werden konnten. Entsprechend ihrer Konturlänge haben sie Molekulargewichte zwischen 1,1 und 14 x 10^6. Die Summe der Molekulargewichte ist gleich der der zirkulären DNA.

Die relative Lage der vier größten Fragmente in dem zirkulären Genom konnte durch Denaturierungskartierung bestimmt werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß es in Neurospora nur eine mtDNA homogener Sequenz gibt, die sich durch das Restriktionsenzym Eco R I in definierte Fragmente zerlegen läßt.

Mit der Identifizierung und Lokalisierung der Fragmente eröffnet sich die Möglichkeit der physikalischen Kartierung von mitochondrialen Genen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. P. Borst, Ann. Rev. Biochem. 41, 333 - 375 (1972)

2. G. Schatz und T. L. Mason, Ann. Rev. Biochem. 43, 51 - 87 (1974)

3. K. P. Schäfer und H. Küntzel, Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1312 - 1319 (1972)

4. M. Wu, N. Davidson, G. Attardi und Y. Aloni, J. Mol. Biol. 71, 81 - 93 (1972)

5. J.W. Casey, H. J. Hsu, G. S. Getz und M. Rabinowitz, J. Mol. Biol. 88, 735 - 747 (1974)

6. Z. Barath und H. Küntzel, Nature New Biology 240, 195 - 197 (1972)

7. Z. Barath und H. Küntzel, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1371 - 1374 (1972)

8. W. J. Peacock, D. Brutlag, E. Goldring, R. Appels, C. W. Hinton und D. L. Lindsley, Cold Spring Harbor Symposium on quantitative biology Vol. XXXVIII, 405 - 416 (1974)

9. P. Borst und A. M. Kroon, Int. Rev. Cytology 26, 107 - 185 (1969)

10. N. W. Gillham, Ann. Rev. Genetics 8, 347 - 391 (1974)

11. G. Faye, H. Fukuhara, C. Grandchamp, J. Lozowska, F. Michel, J. Casey, G. S. Getz, J. Locker, M. Rabinowitz, M. Bolotin-Fukuhara, D. Coen, J. Deutsch, B. Dujon, P. Netter und P. P. Slonimski, Biochimie 55, 779 - 792 (1973)

12. Y. Kuriyama und D. J. L. Luck, J. Mol. Biol. 83, 253 - 266 (1974)

13. W. A. Scott und H. K. Mitchell, Biochemistry 8, 4283 (1969)

14. R. M. Brambl und D. O. Woodward, Nature 238, 198 - 200 (1972)

15. H. J. Vogel, Microbiol. Genet. Bull. 13, 42 (1956)

16. K. P. Schäfer, G. Bugge, M. Grandi und H. Küntzel, Eur. J. Biochem. 21, 478 - 488 (1971)

17. H. Weiss, G. v. Jagow, M. Klingenberg und T. Bücher, Eur. J. Biochem. 14, 75 - 82 (1970)

18. M.M.K. Nass, J. Mol. Biol. 42, 529 - 545 (1969)

19. K. P. Chakraborty und H. S. Loring, J. Biol. Chem. 235, 2122 - 2126 (1960)

20. M. Uziel, C. K. Koh und W. E. Cohn, Anal. Biochem. 25, 77 - 98 (1968)

21. P. A. Sharp, B. Sudgen und J. Sambrock, Biochemistry 12, 3055 - 3063 (1973)

22. D. Lang und M. Mitani, Biopolymers 9, 373 - 379 (1970)

23. D. J. L. Luck und E. Reich, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 931 - 938 (1964)

24. G. D. Clark-Walker und G. L. G. Miklos, Eur. J. Biochem. 41, 359 - 365 (1974)

25. H. E. Bond, J. A. Cooper, D. P. Courington und J. S. Wood, Science 165, 705 - 706 (1969)

26. C. A. Smith und J. Vinograd, J. Mol. Biol. 69, 163 - 178 (1972)

27. M. Guerineau, P. P. Slonimski und P. R. Avner, Biochem. Biophys. Res. Comm. 61, 462 - 469 (1974)

28. C. P. Hollenberg, P. Borst und E. F. J. van Bruggen, Biochim. Biophys. Acta 209, 1 - 15 (1970)

29. E. Agsteribbe, A. M. Kroon und E. F. J. van Bruggen, Biochim. Biophys. Acta 269, 299 - 303 (1972)

30. D. A. Clayton und R. M. Brambl, Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 1477 - 1482 (1972)

31. A. C. Arnberg, E. F. J. van Bruggen, P. Borst, R. A. Clegg, R. B. H. Schutgens, P. J. Weijers und R. W. Goldbach, Biochim. Biophys. Acta 383, 359 - 369 (1975)

32. S. Linn und J. R. Lehman, J. Biol. Chem. 241, 2694 - 2699 (1966)

33. J. J. Mc Cormick, L. J. Larson und V. M. Maher, Biochim. Biophys. Acta 349, 145 - 147 (1974)

34. D. Lang, J. Mol. Biol. 54, 557 - 565 (1970)

35. R. B. Inman, J. Mol. Biol. 28, 103 - 116 (1967)

36. K. Yoshiike, A. Furuno und K. Suzuki, J. Mol. Biol. 70, 415 - 423 (1972)

37. B. K. Tye, J. A. Huberman, D. Botstein, J. Mol. Biol. 85, 501 - 527 (1974)

38. J. Wolfson, D. Dressler und M. Magazin, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 499 - 504 (1972)

39. B. Gomez und D. Lang, J. Mol. Biol. 70, 239 - 251 (1972)

40. H. J. Burkardt, Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg (1974)

41. F. Mayer, A. J. Mazaitis und A. Pühler, J. Virol. im Druck

42. A. Prunell und G. Bernardi, J. Mol. Biol. 86, 825 - 841 (1974)

43. W. Bauer und J. Vinograd, in "Basic principles in nucleic acid research" ed. P. O. P. TS'O, Acad. Press New York und London 1974 (pp. 273/274)

44. H. Bujard, J. Mol. Biol. 49, 125 - 137 (1970)

45. M. Meselson, R. Yuan und J. Heywood, Ann. Rev. Biochem. 41, 447 - 466

46. J. Hedgpeth, H. M. Goodman und H. W. Boyer, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3448 - 3452 (1972)

47. H. Smith und D. Nathans, J. Mol. Biol. 81, 419 - 423 (1973)

48. B. Allet, P. G. N. Jeppensen, K. J. Katagiri und H. Delius, Nature 241, 120 - 123 (1973)

49. D. D. Wood und D. J. L. Luck, J. Mol. Biol. 41, 211 - 224 ((1969)

50. G. Christiansen, C. Christiansen und A. L. Bak, Nucleic Acid Research 2, 197 - 210 (1975)

51. D. R. Wolstenholme, R. G. Kirschner und N. J. Gross, J. Cell. Biol. 53, 393 - 406 (1972)

52. C. A. Hutchinson, J. E. Newbold. S. S. Potter und M. H. Edgell, Nature 251, 536 - 538 (1974)

53. D. L. Robberson. D. A. Clayton und J. F. Morrow, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4447 - 4451 (1974)

54. W. M. Brown und J. Vinograd, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4617 - 4621 (1974)

55. R. B. Inman, in "Methods in Enzymology" Vol. XXIX
ed. L. Grossmann und K. Moldave (pp. 451 - 458)

Herrn Dr. H. Küntzel danke ich für die Vergabe dieser Arbeit und alle Anregungen und Diskussionen während ihrer Durchführung.

Herrn Prof. Dr. F. Cramer danke ich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F. Mayer möchte ich für die Einführung in elektronenmikroskopische Methoden und die Möglichkeit, in seinem Labor zu arbeiten, danken.

Herrn Dr. A. Pühler danke ich für die Computer-Auswertungen und besonders sein Interesse an der Entwicklung neuer Programme, ohne die viele Auswertungen nicht möglich gewesen wären.

Mein Dank gilt ferner den Herren Dr. E. Bade, Dr. H. Burckardt und Dr. M. Sprinzl.

LEBENSLAUF

Name:	Bernard, Hans-Ulrich
Geburtsdatum:	22. 8. 1948
Geburtsort:	Hildesheim
Vater:	Friedrich Bernard, heute Oberstudienrat i. R.
Mutter:	Felizitas Bernard, geb. Smikalla, Hausfrau verstorben 1968
Grundschule:	Ostern 1955 - Ostern 1959, Moltke-Schule Hildesheim
Gymnasium:	Ostern 1959 - Juni 1967, Gymnasium Josephinum, Hildesheim, hier Abitur im Juni 1967
Wehrpflicht:	Juli 1967 - September 1968, Northeim
Studium:	Wintersemester 1968/69 bis Sommersemester 1975, Universität Göttingen
Vordiplom:	Oktober 1970 in Mikrobiologie, Botanik, Chemie und Physik
Diplom:	Prüfung im Oktober 1972 in Mikrobiologie, physiologischer Chemie und physikalischer Chemie; experimentelle Arbeit bei Prof. Dr. H. G. Schlegel, Inst. f. Mikrobiologie Abschluß Juni 1973
Doktorarbeit:	Anfertigung der vorliegenden Arbeit von Juli 1973 - Mai 1975 unter der Leitung von Herrn Dr. H. Küntzel am Max-Planck-Institut f. experimentelle Medizin, Gött.